

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss der Hemmung des späten spannungsabhängigen
Natrium-Kanals durch Ranolazin auf Endothelfunktion und
Atherosklerose im Modell der ApoE-Knockout Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2016

vorgelegt von: Jennifer Natalie Wolf
geboren am 04.04.1983
in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Abstract	7
3. Einleitung	9
3.1. Epidemiologie und Klinik der koronaren Herzkrankheit	9
3.2. Pathophysiologie der Atherosklerose	10
3.2.1. Aufbau des Endothels	10
3.2.2. Funktion des Endothels	10
3.2.3. Endotheliale Dysfunktion	11
3.2.4. Entstehung der Atherosklerose	12
3.3. Präventive und prognoseverbessernde Therapie der stabilen KHK	15
3.3.1. Antithrombozytäre Therapie ASS	15
3.3.2. Statine	15
3.3.3. ACE-Hemmer	16
3.3.4. Symptomatische Therapie der KHK	16
3.3.4.1. Betablocker	16
3.3.4.2. Nitroglycerin	16
3.3.4.3. Kalziumantagonisten	17
3.3.4.4. Ranolazin	17
3.4.4.1. Vaskuläre Effekte von Ranolazin	18
3.5. Fragestellung der Arbeit	19
4. Material und Methoden	20
4.1. Materialien	20
4.1.1. Substanzen und Hersteller	20
4.1.2. Geräte und Zubehör	22
4.1.2.1. Isometrische Spannungsmessung im Organbad	23
4.1.2.2. Histologie	23
4.1.2.3. Software	24
4.2. Methodik	26
4.2.1. Tiere und Tierhaltung	26
4.2.2. Studienprotokoll	27
4.2.3. Blutdruckmessung	27
4.2.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme	27
4.2.5. Versuchsaufbau Organbad	28

4.2.5.1. Kontraktion durch Phenylephrin	29
4.2.5.2. Endothelvermittelte Relaxation durch Carbachol	29
4.2.5.3. Reversibilität der endothelabhängigen Relaxation durch L-NAME	29
4.2.5.4. Endothelunabhängige Relaxation mit Glyzeroltrinitrat	30
4.2.6. Histologie	31
4.2.6.1. Kryotomie	31
4.2.6.2. Mikroskopische Aufnahmen	31
4.2.6.3. DHE Färbung	31
4.2.6.4. Ölrot-O-Färbung	32
4.2.6.5. Sirius Red	33
4.2.6.6. Makrophagen-Färbung	34
4.3. Statistische Auswertung	35
5. Ergebnisse	36
5.1. Effekte der kardialen Na-Kanal - Inhibition durch Ranolazin im Modell der ApoE-Knockout Maus	36
5.1.1. Plasmalipide	36
5.1.2. Vitalparameter	37
5.1.3. Endotheliale Relaxation durch Ranolazin	38
5.1.4. Histologische Untersuchung an Aortenringen nach Intervention mit Ranolazin	39
5.1.4.1. Entstehung atherosklerotischer Plaques unter Ranolazin	39
5.1.4.2. Entstehung des fibrotischen Remodellings unter Ranolazin	40
5.1.4.3. Radikale Sauerstoffspezies	41
5.1.4.4. Anteil der Makrophagen innerhalb des Plaque Areal	42
6. Diskussion	43
6.1. Effekte der Hemmung von spannungsabhängigen Na-Kanälen an kardialen Zellen auf die endothelabhängige Relaxation und Atherosklerose in der ApoE-Knockout Maus	43
6.1.1. Endotheliale Dysfunktion in der ApoE-Knockout Maus	43
6.1.2. Atherogenese in dem Modell der ApoE-Knockout Maus	45
6.1.3. Plasmalipide im Modell der ApoE-Knockout Maus	46
6.1.4. Vitalparameter im Modell der ApoE-Knockout Maus	46
6.1.5. Fibrotisches Remodelling in der ApoE-Knockout Maus	47

6.1.6. Anteil der Makrophagen im atheromatösen Plaque Anteil in der ApoE-Knockout Maus	47
6.1.7. Anteil reaktiver Sauerstoffspezies in der ApoE-Knockout Maus	48
6.2. Fazit	49
7. Literaturverzeichnis	50
8. Danksagung	63
Lebenslauf	

1. Zusammenfassung

Ranolazin ist ein Piperazin-Derivat und zur Therapie der stabilen Angina pectoris zugelassen. Die antianginöse Wirkung besteht in der Hemmung des späten Natrium Einstroms in die Myokardzelle. Dies führt zur Abnahme des Natrium- und Calcium Überschusses in der Zelle. Die endotheliale Dysfunktion ist der initiale Schritt der Atherogenese und für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit mit verantwortlich. Die Wirkung von Ranolazin auf die Endothelfunktion und Genese der Atherosklerose wurde in einem hypercholesterinämischen Mausmodell (ApoE) untersucht. Wildtyp- und ApoE-Mäuse wurden mit einer cholesterinreichen Diät sowie Ranolazin in Kombination mit Ketokonazol (Ranolazin 0,5%: 600mg/kg Körpergewicht; Ketokonazol 0,03%: 40mg/kg Körpergewicht) oder Ketokonazol oder Plazebo in Monotherapie über einen Zeitraum von acht Wochen gefüttert. Ketokonazol wurde verabreicht um den gewünschten Wirk- bzw. Plasmaspiegel des Ranolazins zu gewährleisten. Vorgehende Experimente beim Hersteller (Dr. Roden, Gilead, persönliche Kommunikation) deuteten auf die Relevanz der gleichzeitigen Ketokonazol-Gabe hin, da dies die Ranolazin Konzentration im Plasma um das fünf- bis zehnfache erhöht. Es ist ebenfalls bekannt, dass der CYP3A4 Inhibitor Ketokonazol beim Menschen die Plasma Konzentration von Ranolazin um das 4fache erhöht (Jerling et al., J Clin.Pharmacol 2005). Die Wildtyp-Tiere (WT, C57/B6J) dienten als Kontrollgruppe. Die endotheliale Funktion der Aortenringe wurde durch pharmakologische Stimulation mittels Carbachol (endothelabhängig) und Glyceroltrinitrat (endothelunabhängig) ermittelt. Die Größen der atherosklerotischen Gefäßläsionen wurden mit Hilfe der Ölrot-O-Färbung, die vaskulären Kollagengehalte mittels Sirius-Red-Färbung und die Veränderungen der Produktion an freien Radikalen (ROS) durch semiquantitative Immunhistochemie mit Dihydroethidium bestimmt. Die Behandlung von transgenen, hyperlipidämischen Apolipoprotein E- defizienten Mäusen mit Ranolazin führte unter Zugabe von Carbachol zu einer signifikanten Abnahme der Endothelfunktion (Ranolazin/Ketokonazol: $28.8 \pm 3.0\%$ der maximalen Phenylephrin-induzierten Kontraktion) verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe ($46.4 \pm 5.1\%$, $p < 0.05$). Die mit Ranolazin/Ketokonazol behandelten Versuchstiere zeigten in der Ölrot-O-Färbung eine signifikante Zunahme atherosklerotischer Plaques (Ranolazin/Ketokonazol: $52 \pm 5\%$, $p < 0.01$ verglichen mit ApoE^{-/-}) wohingegen die mit Ketokonazol als

Monotherapie behandelten Tiere ein konstantes Ausmaß an Plaque aufwiesen. Der Kollagengehalt innerhalb der Aorta zeigte mit Hilfe der Sirius-Red - Färbemethode einen signifikanten Anstieg unter der Behandlung mit Ranolazin. Ranolazin hatte keinen Einfluss auf den oxidativen Stress, dargestellt in der DHE-Färbemethode. Die beobachteten Ergebnisse waren unabhängig von Blutdruck, Herzfrequenz und Lipidstatus. Ob diese Daten für das Tiermodell spezifisch sind und Auswirkungen auf den Menschen besitzen ist nicht bekannt, so dass weitere Studien erforderlich sind.

2. Abstract

Ranolazine is a piperazine derivative and approved for the treatment of stable angina pectoris. The antianginal effect is mediated by the inhibition of the late sodium influx into cardiac cells. This leads to a loss of sodium and calcium surplus in the cardiac cell. Endothelial dysfunction, as the initial step of atherogenesis, is responsible for the genesis of coronary artery disease. The effect of ranolazine on endothelial function and genesis of atherosclerosis has been studied in a hyperlipidemic mouse model. Wildtype and apoE mice were treated with a cholesterol rich diet and ranolazine in combination with ketoconazole or ketoconazole only or placebo only over a period of eight weeks. Ketoconazole was added in order to ensure the desired effect level and plasma level of ranolazine. Previous experiments by the manufacturer (Dr.Roden, Gieald) indicated the relevance of concurrent administration of ketoconazole as this increases ranolazine plasma concentration by five to ten fold. It is also known, that the CYP3A4 inhibitor ketoconazole increases plasma concentrations in humans by four fold (Jerling et al., J Clin.Pharmacol 2005). Wildtype (WT, C57/B6) mice served as control. Endothelial function of aortic rings was assessed by pharmacological stimulation with carbachol (endothelium-dependent) using glyceroltrinitrate (endothelium-independent) as control. Atherosclerotic lesion formation was evaluated with Oil Red staining and vascular collagen content was determined by Sirius Red staining. Modulation of reactive oxygen species (ROS) production was determined by semiquantitative immunohistochemical staining with dihydroethidium. Treatment of transgenic, hyperlipidemic, apolipoprotein- E deficient mice with ranolazine, showed a significant decrease in endothelial function at 10 μ M carbachol after eight weeks (ranolazine/ketokonazole: $28.8 \pm 3.0\%$) compared to ApoE control ($46.4 \pm 5.1\%$, $p < 0.05$). Animals treated with ranolazine/ketoconazole showed a significant increase in atherosclerotic plaque burden represented by Oil Red staining (ranolazine/ketokonazole: $52 \pm 5\%$, $p < 0.01$) compared to ApoEcontrol whereas mice treated with ketoconazole as a monotherapy exhibited a constant amount of plaque. Sirius red histological analysis revealed increased aortic collagen content in mice receiving ketoconazole/ranolazine. Ranolazine had no effect on oxidative stress, illustrated by DHE staining. Furthermore, there were no effects on plasma lipids, blood pressure, heart rate and release of high-sensitivity C-reactive protein. If these

data are unique to the animal model and have effects in humans, is currently unknown and will require further studies.

3. Einleitung

3.1. Epidemiologie und Klinik der koronaren Herzkrankheit (KHK)

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut aktueller Todesursachenstatistik des Informationssystems für Gesundheitsberichterstattung des Bundes in den westlichen Industrieländern noch immer Hauptursache für einen frühzeitigen Tod (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016). In Deutschland verstarben im Jahr 2014 338056 Menschen im Rahmen kardiovaskulärer Ereignisse, was einem prozentualen Anteil von 38,9 % an den gesamten Todesursachen entspricht (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016). Die Angina pectoris, das akute Koronarsyndrom und der plötzliche Herztod stellen mögliche Erstmanifestationen der koronaren Herzerkrankung (KHK) dar. Die stabile Angina pectoris als Hauptmanifestation der koronaren Herzerkrankung manifestiert sich zunehmend zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr (Tarkin et al., 2013). Das Risiko an einer KHK zu erkranken ist bei Männern höher. Ebenfalls erkranken Männer im Durchschnitt um bis zu fünf Jahre früher an einer KHK im Gegensatz zu den Frauen. In der Ätiologie der KHK sind atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand, verursacht durch die endotheliale Dysfunktion, nachgewiesen. Im Laufe der Zeit führt die Progression der Atherosklerose zu Koronarstenosen. Ab einer Lumeneinengung von über 50% spricht man von einer signifikanten Stenose (Patel et al., 2010). Ab einer Stenose von 75%, welche als kritisch klassifiziert ist, kann diese zur sog. Angina pectoris Symptomatik mit retrosternalen Schmerzen und Dyspnoe führen. Die Entstehung und Progression einer KHK wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigt. Zu diesen zählen der Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyper- und Dyslipoproteinämien, Lebensalter, Adipositas und positive Familienanamnese (LeBlanc et al., 2015, Mosca et al., 2004). Das Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris, die sich als reversibler Brustschmerz mit Engegefühl und Angstsymptomatik darstellen kann. Die koronare Herzerkrankung kann des Weiteren zu einer Einschränkung der Lebensqualität mit wiederholten Krankenhausaufenthalten führen. Dies wiederum führt langfristig zu einem Anstieg der Kosten des gesamten Gesundheitssystems. Die stabile Angina pectoris entsteht durch eine reversible Ischämie des Myokards von gleichbleibender Intensität und Dauer, meist im Rahmen einer atherosklerotisch bedingten Gefäßobstruktion, mit einem Missverhältnis

zwischen Sauerstoffangebot und aktuellem Sauerstoffbedarf (Tarkin et al., 2013). Dahingegen kann sich die instabile Form der Angina pectoris in Dauer und Intensität der Symptomatik unterscheiden. Da die Bevölkerung in den kommenden Jahrzehnten immer älter wird, stehen wir aufgrund zunehmender Morbidität vor einem großen gesundheitsökonomischen Problem.

3.2. Pathophysiologie der Atherosklerose

3.2.1. Endothelaufbau

Das aus platten Endothelzellen bestehende Endothel ist eine ca. 1 µm dicke Schicht, welche die Gefäße des Körpers von innen auskleidet, und somit eine physiologische Barriere zwischen Gefäßen und Gewebe darstellt. Die Permeabilitätsbarriere des Endothels wird zum einen, durch die Beschaffenheit der Oberflächenglykokalix und zum anderen durch die zahlreichen Zell-Zell-Verbindungen aufrechterhalten. Es besitzt somit einen wichtigen Einfluss auf den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe (Widmer et al., 2014).

3.2.2. Endothelfunktion

Die Aufgabe des Endothels besteht in der Freisetzung zahlreicher gefäßprotektiver und vasodilatatorischer Mediatoren wie Prostazyklin (PGI₂), EDHF (Endothel-derived hyperpolarization factor) und Stickstoffmonoxid (NO), welche zum einen den Gefäßtonus regulieren, und zum anderen die Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsion und Aggregation hemmen (Busse et al., 2003; Zeiher et al., 1991). NO stellt den wichtigsten Vasodilatator des Endothels dar und wird durch die NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff synthetisiert (Busse, Fleming et al., 2003). Die Vasodilatation wird vermittelt durch die Bindung an die lösliche Guanylatzyklase, die dann ihrerseits zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat (GTP) herstellt. cGMP aktiviert die Proteinkinase G, welche dann nach Phosphorylierung zellulärer Proteine wie Phospholamban und Kaliumkanäle, eine Senkung des intrazellulären Calciums bewirkt und schließlich zur Relaxation der Gefäße führt (Schulz et al., 1994; De la Lande et al., 1996; Hofmann et al., 2000). Endothelzellen sezernieren auch vasokonstriktorische Substanzen wie Angiotensin II, Endothelin-1 und Thromboxan A₂. Gerade Thromboxan A₂ fungiert als

direkter Gegenspieler zu Prostazyklin, da es die Thrombozytenaggregation fördert, und gleichzeitig einen starken Vasokonstriktor der Gefäße darstellt (Cheng et al., 2002). Des Weiteren regulieren die Endothelzellen den Stoffaustausch zwischen Blut und Interstitium. Große Moleküle wie beispielsweise Albumin werden mittels Diffusion und Konvektion durch die großen Caveolae transportiert, wohingegen die kleinen und wasserlöslichen Substanzen mit Hilfe von Zell-Zell-Verbindungen weitergeleitet werden.

3.2.3. Endotheliale Dysfunktion

Im Anfangsstadium der KHK kommt es zu entzündlichen Reaktionen der Gefäßwand und somit zur sog. endothelialen Dysfunktion (Ross et al., 1993). Die endotheliale Dysfunktion entspricht dem initialen Schritt der Atherosklerose und ist somit eine Systemerkrankung, welche einen erheblichen Einfluss auf Lebensqualität und Lebenserwartung, sowie eine Vorhersehbarkeit bezogen auf kardiovaskuläre Ereignisse besitzt (Smriti et al., 2009; Schächinger et al., 2000). In vorgeschädigten Endothelzellen kommt es aufgrund des zunehmenden oxidativen Stresses, verursacht durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), zu einer verminderten Freisetzung von NO und somit zu einer eingeschränkten Vasodilatationsfähigkeit der Gefäße (Schächinger et al., 2000). Dies führt zu einer gesteigerten Hyperadhäsivität der Leukozyten und Thrombozyten und vermehrter Einwanderung inflammatorischer Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, was durch deren Zytokinausschüttung zur Schädigung der arteriellen Gefäßwand führt (Takahashi et al., 2002; Schwartz et al., 1989). Die ROS-Synthese wird unter anderem durch die Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) mittels Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 stimuliert. Nikotinabusus, Diabetes mellitus sowie Hypercholesterinämie und Hyperhomocysteinämie (Baszczuk et al., 2014) verstärken die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und auch gleichermaßen die Expression des AT1-Rezeptors (Higashi et al., 2009; Warnholtz et al., 1999), was dann zur weiteren Abnahme der kardialen Leistungsfähigkeit führt. Die Freisetzung der ROS wird überwiegend durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten katalysiert, die aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität, zu einer Permeabilitätssteigerung der Zellmembranen, sowie zu einer Schädigung der DNA führen. In zahlreichen *in vitro*

sowie *in vivo* Studien konnte der antiinflammatorische Effekt von NO nachgewiesen werden, der durch die Inhibition der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 und eine verminderte Expression des Tissue Factors (TF), gekennzeichnet ist (Kubes et al., 1991). Ausgehend von der Tatsache, dass die endotheliale Dysfunktion mit ihren inflammatorischen Effekten zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque reversibel ist wird deutlich, dass die Verbesserung der Endothelfunktion ein langfristiges Ziel in der kardiovaskulären Medizin darstellt (Totoson et al., 2014).

3.2.4. Entstehung der Atherosklerose (Abb.1,2)

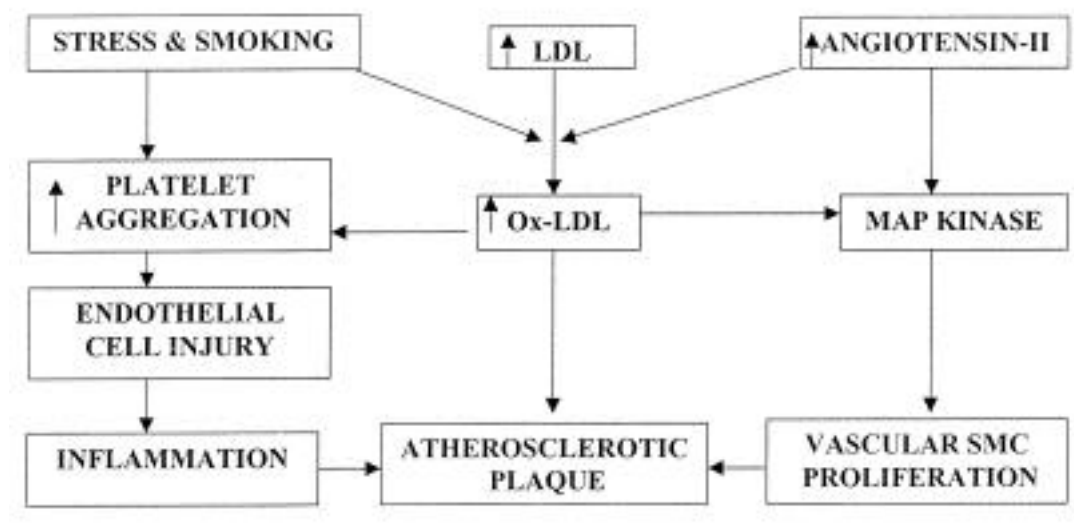


Abb.1: Schematische Darstellung der Entwicklung atherosklerotischer Plaque durch LDL, Schädigung von Endothelzellen und Proliferation glatter Muskelzellen. Singh et al., Exp.Clin.Cardiol. 2002 Spring; 7(1): 40–53.

Die endotheliale Dysfunktion entspricht dem initialen Schritt der Atherosklerose (Smriti et al., 2009; Schächinger et al., 2000). Hierbei scheint vor allem das LDL-Cholesterin mit seinem oxidativen Produkt (ox-LDL) eine wichtige Rolle zu spielen. Die atherosklerotisch veränderten Gefäße führen durch die Einwanderung von Entzündungszellen und oxidiertem LDL, welches von Makrophagen phagozytiert wird, zur Bildung einer zunächst stabilen Plaque und somit zu einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens (Abb.2). Charakteristisch für diese Plaquebildung sind weiße Lipidablagerungen in Form von fatty streaks (Stary et al., 1994), sowie lipidgefüllte Makrophagen (Schaumzellen, foam cells), zahlreiche glatte

Muskelzellen, Thrombozyten und Glykosaminoglykane (Ross et al., 1976, 1986). Die gesteigerte Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle, vor allem von VCAM-1, führt zu einer vermehrten Migration von Makrophagen und Monozyten in die Gefäßwand, mit gleichzeitiger Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Mohana et al., 2015). Makrophagen sezernieren Interleukine, Tumor-Nekrose Faktor, Komplementfaktoren, sowie freie Sauerstoffradikale, die in ihrer Gesamtheit zu einer weiteren Schädigung der endothelialen Gefäßwand führen (Jang et al., 1993). Ein NO-Mangel kann durch eine Fehlfunktion der endothelialen NO-Synthase verursacht werden, die durch ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) gefördert wird, einem natürlichen Inhibitor der Synthase. Die Freisetzung von Proteasen, Kollagenasen und Elastase durch die Makrophagen bilden eine Art Abszess in der Plaque, abgedeckt durch eine dünne faserige Kappe (Jang et al., 1993). Diese Bestandteile bilden in ihrer Summe unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-derived growth factor), eine sog. stabile fibröse Kappe, die ab einer signifikanten Lumeneinengung von ca. 50% zu pektanginösen Beschwerden führen kann (Ross et al., 1976,1986). Durch die gestörte endotheliale Vasomotorik überwiegt schliesslich der Einfluss vasokonstriktorischer Substanzen, wie z.B. Thromboxan A₂, Endothelin und Angiotensin II.

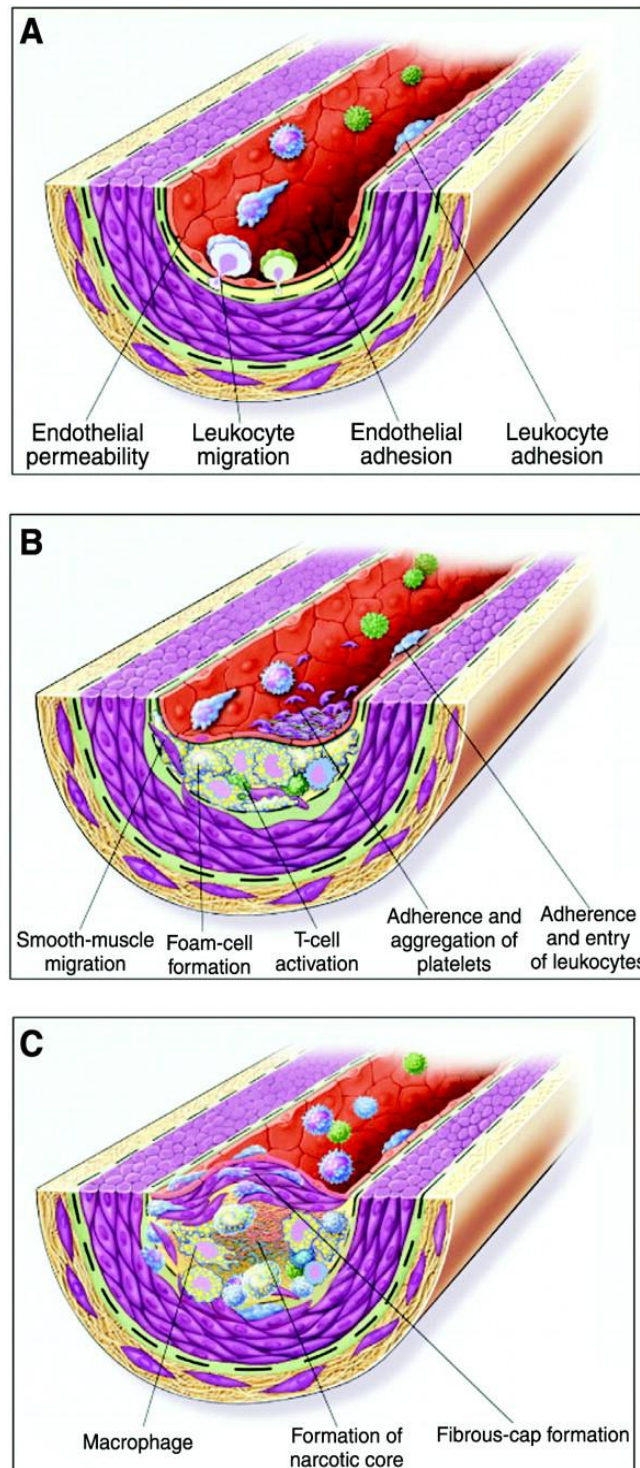


Abb.2: Schematische Darstellung der Genese einer generalisierten Atherosklerose

Die endotheliale Dysfunktion ist Ausgangspunkt der Atherosklerose. Cholesterine und gesättigte Fettsäuren wandern in das Endothel ein und lagern sich ab. Die endotheliale Permeabilität nimmt zu und Leukozyten migrieren in subendotheliale Gefäßschichten. Oxidativer Stress begünstigt das weitere Einwandern von Entzündungszellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen. Darüber hinaus heften sich Thrombozyten an die Intima an. Im weiteren Verlauf kann sich zum einen eine instabile Plaque mit dünner fibröser Kappe und hoher Rupturwahrscheinlichkeit, zum anderen eine fortgeschrittene Plaque mit einer durch glatte Muskelzellen stabilisierten fibrösen Kappe einschließlich nekrotischem Kern und geringer Rupturwahrscheinlichkeit ausbilden. Die instabile Plaque kann in eine fortgeschrittene Plaque übergehen, wie auch umgekehrt eine fortgeschrittene stabile Plaque durch Inflammation und Metalloproteinaseaktivierung zu einer rupturgefährdeten instabilen Plaque werden. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340:115-126

3.3. Präventive und prognoseverbessernde Therapie der stabilen KHK:

3.3.1. Antithrombozytäre Therapie mit ASS

Acetylsalicylsäure (ASS) führt zu einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1), so dass die Freisetzung der Plättchen aggregierenden Thromboxane A₂ aus den Thrombozyten verhindert wird. Dieser Effekt reduziert die Entstehung arterieller thrombotischer Gefäßverschlüsse wie dem Myokardinfarkt und dem ischämischen Schlaganfall, sowie das Auftreten venöser Thrombosen (Gaziano et al., 2014). Gerade bei einer täglichen Dosis von 75 – 100 mg sinkt die Mortalitätsrate, bezogen auf kardiovaskuläre Ereignisse wie dem Myokardinfarkt um 23 % (Gaziano et al., 2014). Bei dieser vergleichsweise niedrigen Dosierung zur Thrombozytenaggregationshemmung besteht ein günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis bezogen auf das Auftreten von Nebenwirkungen, wie beispielsweise gastrointestinale Blutungen und Hirnblutungen (Gitt et al., 2014). Des Weiteren wirkt Aspirin antiinflammatorisch, antipyretisch und analgetisch.

3.3.2. Statine

Statine sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase und führen zu einer signifikanten Senkung des LDL-Cholesterins und ebenfalls zu einer Verminderung kardiovaskulärer Ereignisse (Lancellotti et al., 2015). In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2012 konnte gezeigt werden, dass das Risiko an einem Schlaganfall oder einem akuten Koronarsyndrom zu erkranken, signifikant reduziert wurde, was bedingt ist durch die Statin - vermittelte Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und durch die Senkung des oxidativen Stresses und der reduzierten Inflammation (Sougat et al., 2013). Statine führen nicht nur zur Reduktion des LDL-Cholesterins, sondern auch zu einer signifikanten Steigerung der Endothelfunktion bei Patienten mit Dyslipidämie (Margaritis et al., 2014).

3.3.3. ACE-Hemmer

Der Effekt der ACE-Inhibitoren besteht in einer Reduktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), vermittelt durch die gestörte Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II, welches seinerseits zu einer Vasokonstriktion der Gefäße führt. Dadurch kommt es reaktiv zur Vasodilatation mit Senkung des Blutdrucks und der Nachlast, sowie zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch was einen protektiven Effekt auf die kardialen Gefäße besitzt (Do et al., 2014).

3.4 Symptomatische Therapie der KHK:

3.4.1 Betablocker

Betarezeptorenblocker führen zu einer Reduktion der sympathischen Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin was zur Senkung des kardialen Sauerstoffverbrauchs, der Herzfrequenz und der Wandspannung führt und somit eine antianginöse Wirkung besitzt. Da auch die Nachlast reduziert wird kommt es reaktiv zur Erhöhung von Schlagvolumen und Auswurfvolumen. Der langfristige Effekt zeigt sich in einer negativen Inotropie, Chronotropie und Dromotropie am Herzen. Betablocker werden zur symptomatischen Therapie der koronaren Herzerkrankung, der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz eingesetzt.

3.4.2. Nitrate

Nitrate werden zur Therapie der stabilen Angina pectoris eingesetzt und können intravenös, sowie auch sublingual verabreicht werden. Der Wirkmechanismus besteht in einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), welches zu einer Senkung der Nachlast und so zur Vasorelaxation der Koronargefäße führt. NO führt durch die Aktivierung der Guanylatzyklase zu einer erhöhten Konzentration von cGMP, was dann anschließend zu einer verminderten intrazellulären Calcium-Konzentration und so zur Vasodilatation führt (Den Uil et al., 2009).

3.4.3. Calcium Antagonisten

Calcium Antagonisten werden zur Therapie der arteriellen Hypertonie, sowie zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Durch die Hemmung der spannungsabhängigen Calciumkanäle kommt es zu einer Verminderung des Calciumeinstromes im Herzmuskel, was dann zu einer Verminderung der Kontraktilität führt. Durch diesen negativen inotropen und chronotropen Effekt wird der Sauerstoffverbrauch im Herzen reduziert. Der Blutdruck sinkt im Rahmen der gesteigerten Vasodilatation ab (Godfraind et al., 2014).

3.4.4. Ranolazin

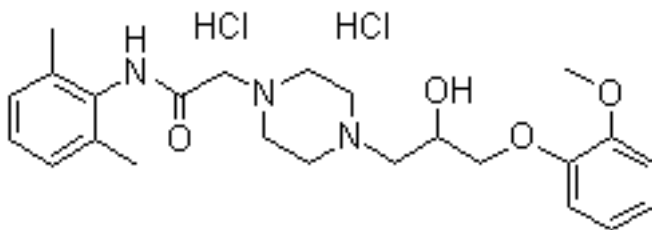


Abb.4: Strukturformel Ranolazin

Ranolazin, chemisch N-(2,6-dimethylphenyl)-4-((2-hydroxy-3-(2-methoxyphenoxy)propyl)) und dem Handelsnamen Ranexa, ist ein Piperazin-Derivat das für die medikamentöse Therapie der stabilen Angina pectoris zugelassen ist (Abb.4, Aldakkak et al., 2013). Die antianginöse und antiischämische Wirkung besteht in einer Hemmung des späten Natrium-Einstroms und somit einer Abnahme des Natrium- und Calcium-Überschusses innerhalb der Zelle (Belardinelli et al., 2004; Chaitman et al., 2006; Stone et al., 2006). Diese Natrium Kanäle, welche sich in kardialen Endothelzellen befinden, sind beteiligt an der endothelialen Reaktion auf Schubspannungskräfte (Walsh et al., 1998; Traub et al., 1999). Folglich kommt es zu einer frühzeitigen Relaxation mit Abnahme des myokardialen Sauerstoffverbrauchs (Wimmer et al., 2013). Der Ca^{2+} -Überschuss innerhalb der Zelle führt langfristig zu elektrischer Instabilität, die durch Arrhythmien, neu auftretende Potentiale, sowie mechanische Schädigung mit abnormaler Kontraktion und Relaxation gekennzeichnet ist. Die verminderte Relaxationsfähigkeit führt zu einem

zunehmenden ATP-Verbrauch und somit zu einer chronischen Minderperfusion des Herzens, manifestiert in pektanginösen Beschwerden (Belardinelli et al., 2004). Die renale Ausscheidung des Medikaments beträgt ca. 5 %, wohingegen der Rest über CYP3A4 in der Leber, sowie zum Teil über CYP2D6 metabolisiert wird (Aldakkak et al., 2014; Ranexa, 2012). In den Studien MARISA und CARISA (Chaitman et al., 2004) sowie MERLIN-TIMI 36 (*Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes*) wurde Ranolazin als Monotherapie und auch in Kombination mit anderen antianginösen Medikamenten getestet (Wilson SR et al., 2009). In allen Studien führte Ranolazin zu einer Reduktion pektanginöser Beschwerden und somit zu einer Steigerung der kardialen Leistungsfähigkeit der Patienten. Die bisherige Therapie der KHK beruhte auf Medikamenten wie Betablockern, Nitraten und Calciumantagonisten. Ranolazin, als relativ neues antianginöses Medikament, hat keinen Einfluss auf die Herzfrequenz und den Blutdruck (Belardinelli et al., 2004).

3.4.4.1. Vaskuläre Effekte von Ranolazin

In einer weiteren Studie (Deshmukh et al., 2009) führte die Gabe von 1000mg Ranolazin (2x täglich) nach sechs Wochen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris zu einer Steigerung des EDV RH-PAT-Index (*Endothel dependent Vasodilatation Reactive-Hyperemia-peripheral arterial tonometry*), was bedeutet, dass die Gabe dieser Substanz zu einer Steigerung der endothelvermittelten Vasodilatation führt und somit einen günstigen Einfluss auf die Endothelfunktion besitzt. Der Index wurde mittels plethysmographischer Pulswellen-Messung an den Fingern bestimmt (Bonetti et al., 2004). Ranolazin ist bereits zur Behandlung der stabilen Angina pectoris zugelassen. Begleiteffekte dieser Substanz auf die Endothelfunktion, sowie die Atherosklerose, so genannte pleiotrope Effekte, sind aufgrund der Vielzahl der kardiovaskulären Hoch-Risiko-Patienten, die diese Substanz voraussichtlich einnehmen werden, von besonderer Bedeutung. Im Vergleich zu den bislang verfügbaren antianginösen Therapeutika, vor allem Betablocker und Nitrate, könnte sich hieraus ein Behandlungsvorteil bezüglich der Häufigkeit kardiovaskulärer Nebenwirkungen ergeben.

3.5. Fragestellung der Arbeit

Einfluss der Hemmung des späten spannungsabhängigen Natrium-Kanals durch Ranolazin auf Endothelfunktion und Atherosklerose im Modell der ApoE-Knockout Maus

Ranolazin, ist ein Piperazin-Derivat, das für die medikamentöse Therapie der stabilen Angina pectoris zugelassen ist (Aldakkak et al., 2013). Die antianginöse und antiischämische Wirkung besteht in einer Hemmung des späten Natrium-Einstroms und somit einer Abnahme des Natrium- und Calcium-Überschusses innerhalb der Zelle (Belardinelli et al., 2004; Chaitman et al., 2006; Stone et al., 2006). Daher wurde im experimentellen Tiermodell untersucht, ob die Hemmung der spannungsabhängigen Natriumkanäle durch Ranolazin atherosklerotische Gefäßläsionen günstig beeinflusst. Diesen Mäusen wurde noch zusätzlich 0,03% Ketokonazol (40mg/kg/KG/d) verabreicht, um den gewünschten Wirk- bzw. Plasmaspiegel des Ranolazins zu gewährleisten. Vorgehende Experimente beim Hersteller (Dr. Roden, Gilead, persönliche Kommunikation) deuteten auf die Relevanz der gleichzeitigen Ketokonazol-Gabe hin, da dies die Ranolazin Konzentration im Plasma um das fünf- bis zehnfache erhöht. Es ist ebenfalls bekannt, dass der CYP3A4 Inhibitor Ketokonazol beim Menschen, die Plasma Konzentration von Ranolazin um das 4fache erhöht (Jerling et al., J Clin.Pharmacol 2005). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Ranolazin auf die Endothelfunktion und die Genese einer generalisierten Atherosklerose in einem hypercholesterinämischen Mausmodell (ApoE - Maus) untersucht.

4.Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Substanzen und Hersteller

Substanz

Aqua dest.,HPLC-gereinigt

Aquatex, wässriges Eindeckmittel

Carbachol

Carbogen (5Vol% CO₂ in O₂)

Chlorwasserstoffsäure

Diaminofluoreszin (DAF)

Dihydroethidium (DHE)

Dikaliumhydrogenphosphat

Dinatriumhydrogenphosphat

Ethylendiamidtetraessigsäure
(EDTA)

Entellan

Ethanol

Glukose

Glyzerin

Glyzin

Glyzeroltrinitrat

Hydralazin

Hersteller

Braun Melsungen
AG

Merck KGaA

Merck KGaA

Praxair

Mallinckrodt Baker

Sigma-Aldrich

Chemie GmbH

Molecular

Probes,Invitrogen

VWR International
GmbH

Merck KGaA

BDH Laboratory
Supplies

Merck KGaA

Carl Roth
GmbH&Co KG

Sigma-Aldrich
Chemie GmbH

Sigma-Aldrich
Chemie GmbH

Sigma-Aldrich
Chemie GmbH

Merck KGaA

Sigma-Aldrich
Chemie GmbH

Igepal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ketamin	Pfizer Pharma GmbH
Magnesiumchlorid	Merck KGaA
Magnesiumsulfat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat	VWR International GmbH
Natriumhydroxid	Merck KGaA
NADPH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-NAME	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ölrot-o	Merck KGaA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenylephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pikrinsäure	Merck KGaA
Ranolazin	Bayer-Chemie
Rompun	Bayer
Saccharose	Merck KGaA
Sirius-Red	Polysciences Europe GmbH
Stickstoff	Praxair
Triethylphosphat	Merck KGaA
Xylol	Merck KGaA

4.1.2. Geräte und Zubehör

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml bzw. 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Feinwaage (Acculab ALC-110.4)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Konusröhrchen, 50 ml bzw. 15 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank -80°C(Profiline ECU)	M.u.T. Labor GmbH, Berlin, Deutschland
Laborwaage (Vicon VIC-212)	Acculab, Edgewood, New York, USA
Magnetrührer (IKA Combimac RCH)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Pasteurpipetten, Polypropylen; 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (64x19 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter pH 526	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pinzette (INOX Gewebepräparation)	Outils-Dumont, Montignez, Schweiz
Pipetten (Research 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Scheren (Gewebepräparation)	FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Vortexer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

Zentrifuge (Sigma 1K15)

Sigma Laborzentrifugen,
Osterode, Deutschland

Zentrifuge (Heraeus Fresco 21)

Thermo Scientific,
Langenselbold,
Deutschland

4.1.2.1. Organbad

Edelstahlhaken mit Titanspitze

Föhr Med.Instruments,
Seeheim-Ober Beerbach,
Deutschland

Messverstärker(BioAmp-04/8)

Föhr Med.Instruments,
Seeheim-Ober Beerbach,
Deutschland

Organbäder 50ml

Föhr Med.Instruments,
Seeheim-Ober Beerbach,
Deutschland

Spannungsabnehmer, isometrisch
(TF-6V50)

W. Fleck, Mainz,
Deutschland

Umlaufthermostat C10

Gebr.Haake GmbH,
Karlsruhe, Deutschland

4.1.2.2. Histologie

Brutschrank 37°C (Kelvitron)

Heraeus Instruments
GmbH, Osterode,
Deutschland

Deckgläser (Stärke 130 µm)

VWR International
GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Digitalkamera für Mikroskopie DXM 1200F

Nikon GmbH, Düsseldorf,
Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Typ E600

Nikon GmbH, Düsseldorf,
Deutschland

Kryomikrotom, Kryostat Leica CM 1900-V5.0

Leica

Lichtmikroskop (Nikon Alphaphot-2 YS2)

Objektträger, polysinebeschichtet

Microsystems, Nussloch,
Deutschland

Nikon GmbH, Düsseldorf,
Deutschland

Menzel GmbH & Co. KG,
Braunschweig,
Deutschland

4.1.2.3. Software

Vitalparameter-Bestimmung

BP 2000 Analysis Software

Visitech Systems Inc, USA

Isometrische Spannungsmessung

FMI VitroDat

Föhr Med. Instruments,
Seeheim-
Ober Beerbach,
Deutschland

Histologie

ACT-1, Version 2.62

Nikon GmbH, Düsseldorf,
Deutschland

Confocal Assistant Application 40, Version 4.02

Todd Clark Brelje,
University of Minnesota,
USA

ImageJ for microscopy, Version 1.37v

Wayne Rashband, NIH, USA

Lucia G/F, Version 4.60

Nikon GmbH, Düsseldorf,
Deutschland

Untersuchungen am Gewebehomogenisat

Labworks Analysis Software, Version 4.6

UVP Inc., Upland, Kanada

Statistische Auswertung

Microsoft Excel 2003

Microsoft, Redmond, USA

Graph Pad Prism, Version 4.03

GraphPad Software Inc.,
La Jolla, CA, USA

SAS 9.1

Statistical Analysis
Software Inc, Cary, USA

4.2. Methodik

4.2.1. Tiere und Tierhaltung

In der experimentellen Studie wurden 20 männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet als Kontrollgruppe. Die weiteren 60 waren apolipoprotein-E-knockout Mäuse (Apo-e/- „B6.129P2“ Apo-e/-). Die Versuchstiere wurden in Käfigen auf Standardeinstreu, je zu fünf, bei 80 prozentiger Luftfeuchtigkeit und 22 Grad Umgebungstemperatur untergebracht. Um einen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren wurden die Käfige ab sechs Uhr morgens, für die Dauer von zwölf Stunden, künstlich beleuchtet. Die Fütterung der Tiere erfolgte im Alter von zehn Wochen für acht Wochen in Form von speziell hergestellten Futterpellets der Firma SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland. 60 Mäuse erhielten eine cholesterinreiche Diät (21% Fett, 1,25% Cholesterin, 19,5% Casein) zur Ausbildung einer generalisierten Atherosklerose. Die restlichen 20 Mäuse (C57Bl/6) dienten als Kontrollgruppe. Weitere 20 Mäuse erhielten 0,5% Ranolazin mit einer Dosierung von 600mg/kg/KG pro Tag. Diesen Mäusen wurde noch zusätzlich 0,03% Ketokonazol (40mg/kg/KG/d) verabreicht, um den gewünschten Wirk- bzw. Plasmaspiegel des Ranolazins zu gewährleisten. Vorgehende Experimente beim Hersteller (Dr. Roden, Gilead, persönliche Kommunikation) deuteten auf die Relevanz der gleichzeitigen Ketokonazol-Gabe hin, da dies die Ranolazin Konzentration im Plasma um das fünf- bis zehnfache erhöht. Es ist ebenfalls bekannt, dass der CYP3A4 Inhibitor Ketokonazol beim Menschen die Plasma Konzentration von Ranolazin um das 4fache erhöht (Jerling et al., J Clin.Pharmacol 2005). Eine weitere ApoE-Kontrollgruppe (20 Mäuse) erhielt lediglich täglich das Medikament Ketokonazol 0,03%. Die Trinkwassermenge pro Tag und Tier lag bei 3ml. Futter- und Trinkwassermenge wurden täglich durch das Pflegepersonal kontrolliert. Die Studie wurde unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz; Abteilung H „Lebensmittel- und Veterinärwesen“, Saarbrücken, 33/2011). Aufgrund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206 ff. ber. S. 1313), zuletzt geändert durch Art. 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2936) in Verbindung mit § 1 Abs. 3 des Gesetzes über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung (VetALG) vom 19. Mai 1999 (Amtsbl. S 844, 851),

geändert durch Art. 8 des Gesetzes Nr. 1632 vom 21. November 2007 (Amtsbl. S. 2393), wurden die Tierversuche durch die Amtstierärztin bewilligt.

4.2.2. Studienprotokoll

Die Gruppen wurden wie folgt eingeteilt (Abb.5):

Maustyp	Apo-e/-	Apo-e/-	Apo-e/-	WT
Behandlung	Ranolazin(600 mg/kg KG)+ Keto(0,03%)	Plazebo	Ketokonazol (0,03%)	Plazebo
Cholesterindiät	X	X	X	X
Anzahl (n)	20	20	20	20

Abb.5: Studienprotokoll

4.2.3. Blutdruckmessung

Ab der zehnten Fütterungswoche erfolgte die tägliche Messung der Vitalparameter, bestehend aus systolischen und diastolischen Blutdruck, sowie der Herzfrequenz. Zur nicht invasiven Messung der Vitalparameter, mittels der sog. Tail-Cuff-Methode, wurden je vier Tiere in eine vom Tageslicht abgeschirmte Box gesetzt, welche ausgestattet mit einer in eine vorgewärmte Bodenplatte integrierten Messeinheit die genaue Datenwiedergabe über einen Computer ermöglicht. Die Blutdruckmanschette wurde am Schwanz der Maus befestigt wodurch die Pulswelle, welche durch den Blutfluss innerhalb der Kaudalarterie entsteht, photoelektrisch erfasst werden kann. Hierzu diente das BP-2000 Blood Pressure Analysis System for mice (Krege et al., 1995). Es wurden pro Tier jeweils zehn Probemessungen vollzogen um die Mäuse an die zunächst ungewohnte Situation zu adaptieren. Danach erfolgten die eigentlichen Messungen der Vitalparameter.

4.2.4. Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Am Ende der 12. Fütterungswoche und nach Messung der Vitalparameter erfolgte die Tötung der Versuchstiere in Narkose, vermittelt durch eine Überdosis Ketamin (20mg) und Xylazin-HCL (Rompun, 2mg), welche intraperitoneal injiziert wurden. Nun erfolgte die Organentnahme. Zunächst wurde zur Bestimmung der Plasmalipidwerte 1ml Blut aus der Aorta abdominalis entnommen und in mit Heparin versehene

Eppendorf Gefäße injiziert und dann anschließend bei 4000rpm für 5min zentrifugiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von minus 80 Grad. Danach wurde Aorta thoracica bis zum Hiatus aorticus, sowie das Herz, aus dem Thorax fein herauspräpariert. Nach feinsten Darstellung von Herz und Gefäßen wurde die Aorta vom Herzen vorsichtig abgesetzt um dann, in je vier kleine jeweils 2-3 mm lange Stücke, geteilt zu werden. Daraufhin wurden die vier Aortenringe in Organbäder überführt um einen detaillierten Aufschluss über die jeweilige Endothelfunktion zu erhalten.

4.2.5. Versuchsablauf im Organbad

Die Aortenringe wurden unmittelbar nach Präparation in 4 mit Tyrode befüllte Organbäder überführt und auf 10 nM vorgespannt und dadurch äquilibriert. In den jeweiligen Organbädern wurden die Aortenlumina an zwei gegenläufigen Haken aufgespannt, welche dann wiederum mit einem isometrischen Spannungsmessgerät verbunden wurden. Die Daten wurden dann über ein computergestütztes System erfasst und gespeichert. Die Aortenringe wurden auf eine Vorspannung in Höhe von 10 mN gebracht und anschließend in das auf 37 Grad vorgewärmte Organbad eingelassen. Sobald die Vorspannung das gewünschte Ausgangsniveau von 10 nM erreicht hatte, begann die eigentliche Kontraktilitätsmessung (Abb.6).

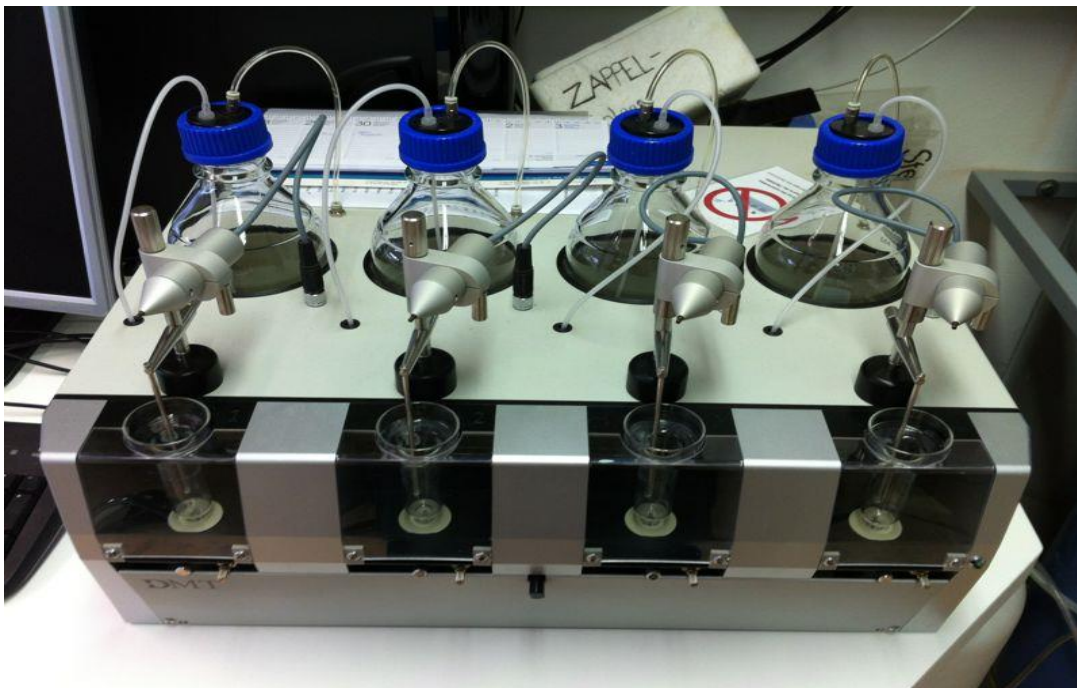


Abb.6: Versuchsaufbau
Organbadapparatur mit Spannungsabnehmern

4.2.5.1. Kontraktionsmechanismus durch Phenylephrin

Durch die agonistische Bindung am Alpha 1-Adrenozeptor kommt es lokal zur Vasokonstriktion. Die vier Aortenringe wurden nun in vier einzelne Organbäder, mit einer Temperatur von je 37 Grad und 95 prozentigem Sauerstoffgehalt, sowie einem fünfprozentigen CO₂ Anteil, überführt. Sie wurden an einem dünnen Haken in Verbindung mit einem Kraftmesser aufgespannt. Nach einer Äquilibrationsphase von 20 Minuten erfolgte die medikamentöse Kontraktion der Aortenringe mit dem alpha1- Rezeptor-Agonisten Phenylephrin. Phenylephrin wurde in steigender Konzentration, nachdem sich ein jeweiliges Kontraktions - Plateau gebildet hatte, impliziert. Konzentrationen Phenylephrin: 1nM → 10nM → 100nM → 1µM → 10µM

4.2.5.2. Enothelabhängige Relaxation durch Carbachol

Ausgehend von der höchsten Phenylephrinkonzentration und somit maximalen Kontraktion der Aorten Ringe, wurde nun unmittelbar Carbachol, in ebenfalls kumulativer Konzentration, zugeführt. Carbachol fungiert als unselektiver Agonist an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (M3) und besitzt demnach die gleiche Funktion wie Acetylcholin an seinem M3 Rezeptor. Die Bindung aktiviert eine Kaskade, bei der es zur gesteigerten NO Freisetzung der Endothelzellen mit nachfolgender Relaxation glatter Muskelzellen, kommt. Carbachol wurde ebenfalls wie Phenylephrin in steigender Konzentration bis zur Ausbildung eines jeweiligen Plateaus zugeführt. Konzentrationen Carbachol: 1nM → 10nM → 100nM → 1µM → 10µM → 100µM. Anschließend wurde die maximale Konzentration mit Kontraktion des Vasokonstriktors in direkten Vergleich gestellt, zur maximalen Dosis des Carbachols mit nachfolgender Relaxation. Die Relaxationsfähigkeit entspricht also der Endothelfunktion des Gefäßes.

4.2.5.3. Reversibilität der endothelabhängigen Relaxation durch die Blockade der eNOS mittels Nw-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME):

L-NAME fungiert als Strukturanalogon von L-Arginin. L-NAME führt somit zur direkten Hemmung der NO-Synthase, eNOS. Durch die Hemmung der NO-Synthase wird folglich weniger Stickoxid innerhalb der Endothelzelle freigesetzt und produziert. Daraufhin wird die endothelvermittelte Relaxation vermindert, wodurch

vasokonstriktorisches Substanzen überhandnehmen (Pfeiffer et al., 1996). L-NAME wurde bei maximaler Carbachol induzierter Relaxation des Endothels in die Organbäder appliziert. Die Reversibilität der Carbachol induzierten Relaxation durch L-NAME zeigte klar auf, dass die beobachteten Effekte endothelabhängig waren. Die Aorten mit defekter Endothelfunktion, welche keinerlei Veränderungen durch L-NAME aufwiesen, wurden in der Endauswertung nicht berücksichtigt, da von einer geschädigten endothelialen Funktion ausgegangen werden musste. Nach Beendigung dieses Versuchs wurden die Organbäder mehrmals gespült, so dass keinerlei Reste der zuvor zugegebenen Substanzen zurückbleiben konnten. Daraufhin erfolgte eine erneute Äquilibrationsphase von fünf Minuten mit einem Vorspannungsniveau von 10 nM.

4.2.5.4. Endothelunabhängige Relaxation mittels Glyzeroltrinitrat:

Glyzeroltrinitrat, auch bekannt als Nitroglycerin, wird in der Medizin verwendet im Rahmen der Angina Pectoris und des Akuten Koronarsyndroms. Sein Effekt ist die endothelunabhängige Vasodilatation und Relaxation der glatten Muskelzellen (Fok et al., 2014). Nitroglycerin wird durch eine Esterase in Nitrit-Ionen hydrolysiert. Das Ergebnis ist Stickstoffmonoxid (NO). NO seinerseits aktiviert eine Kaskade, bestehend aus der Guanylatcyclase, welche dann cGMP vermittelt, die Myosin-Leichtketten-Kinase innerhalb der glatten Muskelzellen hemmt und somit zur Relaxation der glatten Muskulatur führt. Zum Nachweis der endothelunabhängigen Relaxation mittels Glyzeroltrinitrat, wird nun wieder die vasokonstriktorisches Substanz Phenylephrin (PE), mit einer Konzentration von 10 nM, in jedes einzelne Organbad appliziert. Nach der erneuten Ausbildung eines Spannungsplateaus durch PE, wird nun Glyzeroltrinitrat in aufsteigender Konzentration, gegeben. Konzentrationen Glyzeroltrinitrat: 1 nM → 10 nM → 100 nM → 1 µM → 10 µM. Die maximale Dosis Glyzeroltrinitrat entspricht hier der maximalen Konzentration und Kontraktion durch Phenylephrin. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Aortenringe bei einer Temperatur von minus 80 Grad gelagert.

4.2.6. Histologie

4.2.6.1. Kryotomie

Zur detaillierten Darstellung des Aortensinus wurden die aufbewahrten Herzen der Versuchstiere zunächst in kleinste Schalen überführt. Dort wurde anschließend das Einbett-Medium appliziert, bis die Herzen schliesslich aushärteten. Danach erfolgte die Befestigung der Präparate in ein Kryomikrotom, mit einer Temperatur von minus 25 Grad, innerhalb der Kühlkammer. Zur Herstellung der mikroskopischen Präparate wurde eine Schnittdicke von 10 µM gewählt. Nach Übertragung der Schnitte auf sogenannte Polysinebeschichtete Objektträger, wurden diese bei minus 80 Grad gelagert, bis sie schliesslich gefärbt werden konnten.

4.2.6.2. Mikroskopische Aufnahmen

Die gefärbten Schnitte wurden digital mit einem Nikon Mikroskop, inklusive einer Digitalkamera, mittels ACT-1 Software aufgenommen.

4.2.6.3. Dihydroethidium-Färbung (DHE)

Die DHE-Färbung dient der quantitativen und mikroskopischen Darstellung reaktiver Sauerstoffspezies. Dihydroethidium, DHE, wird in Anwesenheit von Superoxidanionen O^{2-} zu fluoreszierendem Ethidium oxidiert (Christensen et al., 2007). Ethidium-Kationen sind ein Bestandteil des Ethidium Bromids, welcher einen aromatischen roten Phenanthridinfarbstoff darstellt, und avid in Nukleinsäuren interkaliert. Dadurch fluoresziert Ethidium rot im UV-Licht - Bereich und dient somit der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von DNA und RNA.

Schnitte:

Auch in diesem Experiment wurden pro Gruppe 5 Tiere verwendet und je 5 Transversalschnitte des Aorten Sinus angefertigt.

Methode:

Die Schnitte wurden zunächst an der Luft getrocknet und dann mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurden in einer Dunkelkammer jeweils 100 µl Färbelösung auf die Schnitte pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation in einer 37°C warmen

Feuchtkammer für 30 Minuten. Die Aufnahme erfolgte im direkten Anschluss mit einer konstanten Belichtungszeit von 1 ms, wobei sich das oxidierte Dihydroethidium im G-2A Fluoreszenzfilter bei einem Exzitationsspektrum von $\lambda = 510-560$ nm und bei einem Langpassfilter mit Absorptionskante von $\lambda = 565$ nm leuchtrot darstellte.

Auswertung:

Zur quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte die Konversion der Farbaufnahmen in 8-bit Graustufen Bilder (Confocal Assistant Application). Ausgewertet wurden die endothelialen Anteile der Aortensinus inklusive der Intima. Anhand der Software ImageJ wurde jedem Blickpunkt des markierten Bereichs entsprechend seiner Helligkeit, ein Pixelwert zwischen 0 und 265 zugeordnet. Danach wurden die Helligkeitsbereiche in ein Histogramm übertragen um den jeweiligen Mittelwert zu errechnen. Hohe Werte entsprechen hohen Intensitäten an Fluoreszenzen was bedeutet, dass in diesen Bereichen des Endothels, die Konzentration von Superoxid-Anionen erhöht ist.

4.2.6.4. Ölrot – O- Färbung

Die Ölrot-O Färbemethode dient zur Darstellung von Lipiden. Ölrot ist ein fettlöslicher Diazofarbstoff mit rötlicher Färbung. Es wurde in der Ranolazin - Studie speziell die atherosklerotische Plaque Zusammensetzung, im subendothelialen Gewebe, untersucht. Alle Lipide färben sich dunkelrot, wohingegen das übrige Gewebe hellrot erscheint.

Schnitte:

Es wurden pro Gruppe je 5 Tiere benötigt. Von diesen wiederum wurden je 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus angefertigt, welche dann im direkten Anschluss gefärbt wurden.

Lösung:

Ölrot-O 500 mg

Triethylphosphat 100ml (60%)

Färbeprotokoll:

- Überführen der luftgetrockneten Gewebeschnitte in 4% Formalin für 60 Minuten

- Spülung in Aqua dest. 3-mal
- Einlegen der Schnitte in Ölrot-O-Gebrauchslösung für mindestens 60 Minuten
- Spülung in Aqua dest. 3-mal
- Eindecken mittels Aquatex mit anschließender Trocknung bei Raumtemperatur

Auswertung durch Hellfeldmikroskopie:

Durch die Lucia G/F Software wurden die atherosklerotischen Läsionen, sowie die Lumina der Gefäße, umrandet, um deren Gesamtfläche zu erhalten. Mit Hilfe dieser Flächen kann nun prozentual die Fläche der Plaque im Verhältnis zur Fläche des gesamten Gefäßlumens berechnet werden.

4.2.6.3. Sirius-Red-Färbung

Bei dieser Methode, zur Darstellung eines eventuellen fibrotischen Remodellings im vaskulären Gewebe, färben sich Kollagenfasern rot und heben sich somit von Zytoplasma und Muskelgewebe, welche als gelb erscheinen, ab (Sweat et al., 1964). Das fibrotische Remodelling, welches eine Erhöhung des Anteils an fibrillären Kollagenfasern innerhalb der Gefäßwand bedeutet, ist eine Folge der Atherogenese und kann mittels Sirius Red im Gewebe detektiert und quantifiziert werden.

Gewebe:

Es wurden jeweils 5 Transversal-Schnitte des Aortensinus auf einem Objektträger platziert. Die Anzahl (n) pro Gruppe betrug 7 Tiere.

Lösung:

Xylol

Ethanol 100% → 90% → 70%

Aqua dest

Pikrinsäure 1,2g 1,2% bei PH=2,0

Sirius Red 0,1g 0,1 % (100ml)

Färbeprotokoll:

- Absteigende Ethanolreihe: 100% → 90% → 70% je 2 Minuten
- Aqua Dest für 5 Minuten
- Aqua Dest für 10 Minuten
- Färbung: 0,1% Sirius-Red 10 Minuten
- Aqua Dest
- Aufsteigende Ethanolreihe: 90% → 100% je 2 Minuten
- Xylol-Bad 2 Minuten
- Eindeckung durch Entellan
- Trocknung der Schnitte unter dem Abzug

Auswertung mittels Hellfeldmikroskop:

Anhand der standardisierten Lucia G/F Software, konnte der Anteil der Kollagenfasern, anhand der Intensität der Rotfärbung des Schnittes erfasst werden, und anschließend in ein direktes Verhältnis zu dem gesamten umliegenden gelb angefärbten Gewebe, gesetzt werden. Die Belichtungszeit war konstant (Sirius Red Macro für Expositionszeiten < 83ms).

4.2.6.6. Makrophagen – Hellfeldfärbung für Gefrierschnitte

Die Untersuchung von Makrophageninfiltraten wurde durch die Färbung des F4/80 Glykoproteins der Zellwand durchgeführt (Gersch et al., 2002; Hume und Gordon, 1983; Hume et al., 1983). Das F4/80 Antigen befindet sich in den größten Subpopulationen von residenten Makrophagen und nimmt während der Reifung der Vorläuferzellen im Blut und Knochenmark zu.

Färbeprotokoll:

Tag 1

- Schnitte gut trocknen lassen
- Fixieren in 4% PFA 15 min
- Rehydrieren in 1x PBS-Tween 10 min
- Mit Fettstift umranden
- AK (Rat Anti Mouse F4/80 Antigen) in PBS-Tween auf die Schnitte geben (c.a. 30µl pro Areal)
 - Negativ Kontrolle

- 1:400
- Inkubation über Nacht (feuchte Kammer, Kühlraum)

Färbeprotokoll

Tag 2

- | | |
|--|-----------|
| • Inkubation in Feuchter Kammer, Wasserbad bei +37°C | 60min |
| • 1x PBS-Tween RT | 3x5min |
| • Blocken in 0,3% H ₂ O ₂ (in PBS-Tween) | 15min |
| • Sekundärantikörper Anti-Rat IgG-Peroxidase 1:100 in | |
| • 1x PBS-Tween + 1% BSA | |
| • Inkubation in Feuchter Kammer, RT | 60min |
| • 1x PBS RT | 3x5min |
| • Inkubation mit Diaminobenzidin in Feuchter Kammer, RT | c.a 20sec |
| • Ampuwa, RT | 5min |
| • Hämatoxylin n. Ehrlich, RT | 1min |
| • A.dest | |
| • Bläuen in Leitungswasser | 15min |
| • A.dest | 2x5min |
| • Eindecken mit Aquatex | |

Auswertung

Die Auswertung erfolgte Mittels Image J.

4.3. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler berechnet. Statistische Signifikanz wurde ab dem p-Wert von < 5% (0,05) bestimmt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc Analyse berechnet (Microsoft Excel 2003; Graph Pad Prism Version 4.03).

5. Ergebnisse

5.1. Effekte der kardialen Na-Kanal - Inhibition durch Ranolazin im Modell der ApoE- Knockout Maus

5.1.1. Plasmalipide

Die Fütterung der Tiere mit einer hypercholesterinämischen Diät (21% Fett, 19,5% Casein, 1,25% Cholesterol) führte nach acht Wochen in der Gruppe der unbehandelten ApoE^{-/-} - Tiere zu einem pathologischen Anstieg des Gesamtcholesterins im Serum auf 1658 mg/dl \pm 119 im Vergleich zu den Serumwerten der Wildtypen in Höhe von 168 mg/dl \pm 8 (Abb.7). Unabhängig von der Intervention wiesen alle ApoE-Tiere signifikant erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte verglichen mit den WT-Tieren auf (MW \pm SEM; **p<0,001 vs Wildtyp, n=10 pro Gruppe).

	Wildtyp (WT)	ApoE ^{-/-}	ApoE ^{-/-} Ranolazin (600mg/kg/d) Ketokonazol	ApoE ^{-/-} Ketokonazol
Gesamtcholesterin (mg/dl)	168 \pm 8	1658 \pm 119**	1925 \pm 100**	1610 \pm 175**
LDL-Cholesterin (mg/dl)	35 \pm 3	1474 \pm 98**	1646 \pm 142**	1452 \pm 153**
HDL-Cholesterin (mg/dl)	151 \pm 9	464 \pm 45	508 \pm 39	483 \pm 43
Triglyzeride (mg/dl)	55 \pm 8	139 \pm 25	290 \pm 60	176 \pm 67

Abb. 7: Lipidprofil der ApoE- und Wildtyp-Tiere

Analyse der Serumlipide nach achtwöchiger hypercholesterinämischer Diät und Behandlung der ApoE Mäuse mit Ranolazin und Ketokonazol in Kombinationstherapie sowie Ketokonazol als Monotherapie. Unabhängig von der Intervention wiesen alle ApoE^{-/-}-Tiere signifikant erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte verglichen mit den WT-Tieren auf. (MW \pm SEM; **p<0,001 vs Wildtyp, n=10 pro Gruppe).

5.1.2. Vitalparameter

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden in den vier Gruppen (Wildtyp, ApoE, ApoE Ranolazin/Ketokonazol, ApoE Ketokonazol) in der zehnten Fütterungswoche mit Hilfe der Tail-Cuff-Methode ermittelt. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz sind mit durchschnittlichen Werten von 72 ± 7 mmHg und 401 ± 42 Schlägen pro Minute signifikant geringer in den Wildtyp-Gruppen verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe (MW \pm SEM; *p<0,05 WT vs ApoE). Die Intervention der Tiere im Rahmen der Monotherapie mit Ketokonazol, sowie der Kombinationstherapie bestehend aus Ranolazin und Ketokonazol (Abb. 8) hatte keinen Einfluss auf die Vitalparameter (MW \pm SEM; **p<0,01 vs WT und ApoE^{-/-})

	Wildtyp (WT)	ApoE -/-	ApoE -/- Ranolazin (600mg/kg/d) Ketokonazol	ApoE -/- Ketokonazol
RR systolisch (mmHg)	72 \pm 7*	99 \pm 6	79 \pm 5**	90 \pm 4**
RR diastolisch (mmHg)	41 \pm 5	61 \pm 5	44 \pm 4	47 \pm 5
Herzfrequenz (Schläge/min)	401 \pm 42	566 \pm 33	460 \pm 32	479 \pm 25

Abb.8: Vitalparameter der ApoE- und Wildtyp-Tiere

Erhebung der Vitalparameter nach achtwöchiger Fütterung mit einer cholesterinreichen Diät und Intervention mit Ranolazin/Ketokonazol sowie alleiniger Behandlung mit Ketokonazol, bestimmt anhand der Tail-Cuff-Methode. Weder die Behandlung mit Ketokonazol, noch mit Ranolazin hatte signifikante Effekte auf die Vitalparameter der Versuchstiere (MW \pm SEM; **p<0,01 vs WT und ApoE^{-/-})

5.1.3. Endotheliale Relaxation durch Ranolazin

Die endothelabhängige Relaxation nach achtwöchiger cholesterinreicher Diät war in den ApoE-Tieren verglichen mit den Wildtypen signifikant reduziert (Abb.9). In den Interventionsgruppen Ranolazin/Ketokonazol war die Endothelfunktion im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ebenfalls signifikant vermindert (10 μ M Carbachol: $29 \pm 3\%$ der maximalen Phenylephrin induzierten Kontraktion) verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe (46 \pm 5%, $p < 0,05$). Die Intervention der ApoE-Mäuse mit Ketokonazol alleine hatte keinen Einfluss auf die Relaxationsfähigkeit des Endothels.

Die endothelunabhängige Relaxation wurde weder durch Ketokonazol noch durch die Gabe von Ranolazin/Ketokonazol verändert.

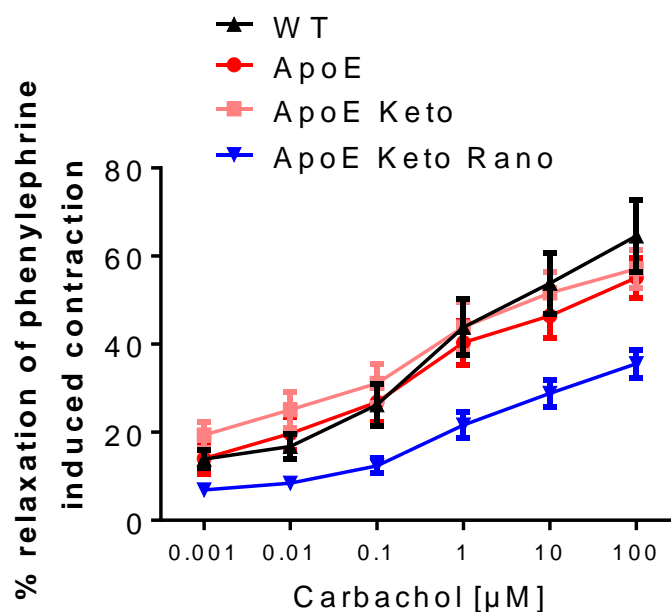


Abb.9: Verminderung der endothelialen Relaxation durch Ranolazin

Nach acht Wochen hypercholesterinämischer Diät war die endothelabhängige Relaxation der Aortenringe, dargestellt durch steigende Carbachol Konzentration im Organbad, unverändert bei der alleinigen Gabe von Ketokonazol. Bei den Mäusen welche mit Ranolazin/Ketokonazol in Kombinationstherapie behandelt wurden war diese signifikant vermindert (10 μ M Carbachol: $29 \pm 3\%$ der maximalen Phenylephrin induzierten Kontraktion) verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe (46 \pm 5%, $p < 0,05$).

5.1.4. Histologische Untersuchungen an Aorten

5.1.4.1. Entstehung atherosklerotischer Plaques unter Ranolazin

Mit Hilfe der Ölrot-O-Färbemethode zeigte sich nach achtwöchiger cholesterinreicher Diät eine signifikante Zunahme atherosklerotischer Plaque innerhalb des Aortenlumens in der ApoE Kontrollgruppe verglichen mit den WT Mäusen. Die mit Ranolazin/Ketokonazol behandelten Versuchstiere zeigten eine Zunahme atherosklerotischer Plaques ($52 \pm 5\%$, $p < 0,01$ verglichen mit ApoE^{-/-}) wohingegen die mit Ketokonazol als Monotherapie behandelten Tiere ein konstantes Ausmaß an Plaque aufwiesen (Abb.10).

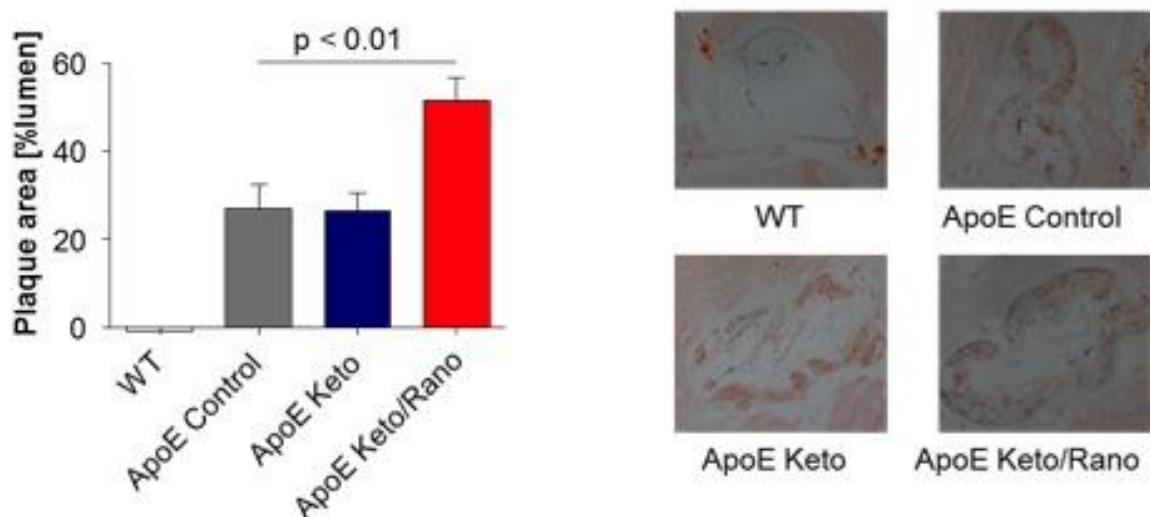


Abb.10: Ausmaß atherosklerotischer Plaque unter Ranolazin

Zunahme atherosklerotischer Plaques nach Behandlung mit Ranolazin. Darstellung der atherosklerotischen Veränderungen im Aortensinus nach Öl-Rot-Färbung. Die achtwöchige hypercholesterinämische Diät führte in ApoE^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der atherosklerotischen Plaques innerhalb des Aortensinus, die durch die medikamentöse Behandlung mit Ranolazin zu einer weiteren Steigerung des Plaque-Ausmaßes führten (MW \pm SEM; Keto/Rano $p < 0,01$ vs ApoE^{-/-} Control)

5.1.4.2. Entstehung des fibrotischen Remodellings unter Ranolazin

Anhand der Sirius-Red Färbung konnte gezeigt werden, dass der Anteil des extrazellulären Kollagens im Rahmen des fibrotischen Remodellings des Aortensinus in der Gruppe der unbehandelten ApoE-Tiere signifikant erhöht war im Vergleich zu den Wildtypen (Abb.11). Innerhalb der Interventionsgruppen Ranolazin in Kombination mit Ketokonazol wurde eine signifikante Steigerung des Kollagenanteils nachgewiesen ($54 \pm 4\%$ Rano/Keto, $p < 0,01$ vs ApoE Control).

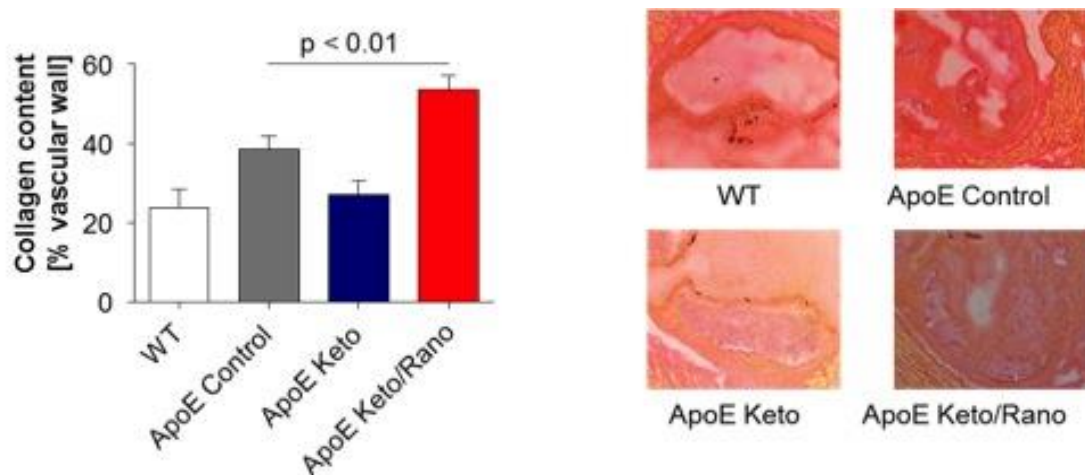


Abb.11: Zunahme des fibrotischen Remodellings unter Intervention mit Ranolazin

Histologische Schnitte des Aortensinus mit Darstellung des Kollagengehalts zur Beurteilung des fibrotischen Remodellings anhand der Sirius-Red Färbung. Nach achtwöchiger cholesterinreicher Diät zeigte sich eine Zunahme des Kollagengehalts und somit des fibrotischen Umbaus der unbehandelten ApoE^{-/-} Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren. Nach medikamentöser Therapie mit Ranolazin konnte eine weitere signifikante Steigerung des Kollagenanteils nachgewiesen werden (MW \pm SEM Rano/Keto, $p < 0,01$ vs ApoE Control).

5.1.4.3. Reaktive Sauerstoffspezies

In der Studie konnte in der DHE Färbemethode kein erhöhter Anteil an Superoxidradikalen in der Gruppe der unbehandelten ApoE -Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Ranolazin und Ketokonazol hatte keinen Effekt auf den oxidativen Stress (Abb.12).

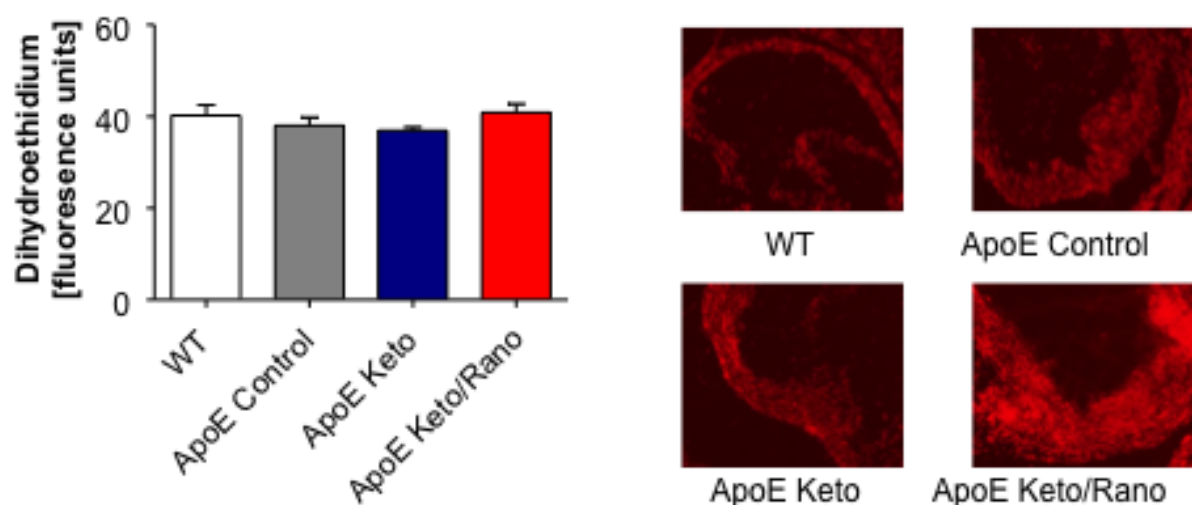


Abb.12: Keine signifikante Veränderung der ROS im Aortensinus nach Intervention mit Ranolazin

Darstellung histologischer Schnittpräparate des Aortensinus in der DHE-Färbung. Nach achtwöchiger hypercholesterinämischer Diät konnte in der unbehandelten Gruppe der ApoE ^{-/-} Tiere eine Zunahme der Fluoreszenz als Zeichen gesteigerten oxidativen Stress im Endothel nachgewiesen werden. In den Interventionsgruppen Ranolazin und Ketokonazol kam es zu keiner signifikanten Veränderung Superoxidradikallast innerhalb des Aortensinus-Endothels.

5.1.4.4. Anteil der Makrophagen innerhalb des Plaque-Areals

Untersuchungen der atherosklerotischen Plaque Zusammensetzung, durch die Makrophagen Färbung, zeigten eine Reduktion des Makrophagenanteils in der Ketokonazolgruppe verglichen mit ApoE, sowie in einem geringeren Ausmaß in der Ranolazin/Ketokonazol Gruppe (Abb. 13) verglichen mit den ApoE Tieren ($35 \pm 10\%$, Rano/Keto $p < 0,05$ vs ApoE^{-/-}; $13 \pm 6\%$, ApoE-Keto $p < 0,01$ vs ApoE^{-/-}).

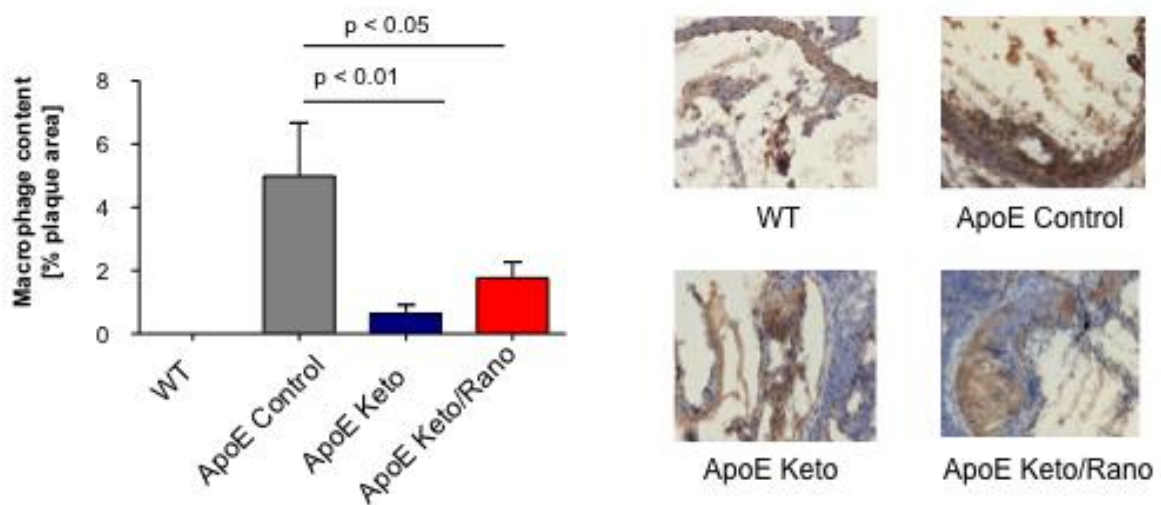


Abb.13: Darstellung histologischer Schnitte des Aortensinus anhand der Makrophagen Färbung

Nach achtwöchiger cholesterinreicher Diät konnte in den Interventionsgruppen Ketokonazol und Ranolazin eine Abnahme des Makrophagen Anteils innerhalb atherosklerotischer Plaque nachgewiesen werden wohingegen das Ausmaß der Reduktion bei den mit Ranolazin und Ketokonazol im Rahmen der Kombinationstherapie behandelten Tieren geringer ausfiel (MW \pm SEM, Rano/Keto $p < 0,05$ vs ApoE^{-/-}; ApoE-Keto $p < 0,01$ vs ApoE^{-/-}).

6. Diskussion

Ranolazin ist ein Piperazin-Derivat und zur Therapie der stabilen Angina pectoris zugelassen. Die antianginöse Wirkung besteht in der Hemmung des späten Natrium Einstroms in die Myokardzelle. Die Wirkung von Ranolazin auf die Endothelfunktion und Genese der Atherosklerose wurde in einem hypercholesterinämischen Mausmodell (ApoE) untersucht. Wildtyp- und ApoE-Mäuse wurden mit einer cholesterinreichen Diät sowie Ranolazin in Kombination mit Ketokonazol oder Ketokonazol oder Plazebo in Monotherapie über einen Zeitraum von acht Wochen gefüttert. Ketokonazol wurde verabreicht, um den gewünschten Wirk- bzw. Plasmaspiegel des Ranolazins zu gewährleisten. Vorgehende Experimente beim Hersteller (Dr. Roden, Gilead, persönliche Kommunikation) deuteten auf die Relevanz der gleichzeitigen Ketokonazol-Gabe hin, da dies die Ranolazin Konzentration im Plasma um das fünf- bis zehnfache erhöht. Die Behandlung mit Ranolazin/Ketokonazol führte zu einer Verminderung der endothelabhängigen Relaxation und gleichzeitig zu einer Zunahme atherosklerotischer Plaqueformation, wohingegen die mit Ketokonazol als Monotherapie behandelten Tiere ein konstantes Ausmaß an Plaque aufwiesen. Innerhalb der Interventionsgruppen Ranolazin in Kombination mit Ketokonazol wurde des Weiteren eine Steigerung des Kollagenanteils nachgewiesen. Untersuchungen der atherosklerotischen Plaque-Zusammensetzung durch die Makrophagen-Färbung zeigten eine Reduktion des Makrophagenanteils in der Ketokonazol -sowie in einem geringeren Ausmaß in der Ranolazin/Ketokonazol Gruppe.

6.1. Effekte der Hemmung von kardialen spannungsabhängigen Na-Kanälen auf die endothelabhängige Relaxation und Atherosklerose in der ApoE-Knockout Maus

6.1.1. Endotheliale Dysfunktion in der ApoE-Knockout Maus

Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer verminderten Freisetzung von NO sowie zur vermehrten Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies ROS, welches eine generalisierte Atherosklerose mit konsekutiver Minderversorgung des Herzmuskels

zur Folge hat (Ross et al., 1993). Diese Minderperfusion des Herzens führt zur Angina pectoris, welche als Hauptmanifestation der koronaren Herzerkrankung zu einer Einschränkung der Lebensqualität führt. In der Ranolazin Studie mit ApoE Knockout Mäusen zeigte sich nach achtwöchiger cholesterinreicher Diät und Ranolazin Therapie eine signifikante Reduktion der endothelialen Funktion, verglichen mit den unbehandelten ApoE- und Wildtyp Mäusen. Dargestellt wurde dieser Effekt anhand steigender Carbachol Konzentration im Organbad mit endothelabhängiger Relaxation in Relation zur maximalen Kontraktion durch Phenylephrin in der Ranolazin/Ketokonazol Gruppe verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe. Die Behandlung der ApoE Mäuse mit Ketokonazol als Monotherapie hatte keinen Einfluss auf die Relaxationsfähigkeit des Endothels. Die endothelunabhängige Relaxation wurde weder durch Ketokonazol noch durch die Gabe von Ranolazin/Ketokonazol verändert. In einer ähnlichen Studie zeigte sich an Aortenringen von Ratten, welche zuvor mit dem Cyclooxygenase Inhibitor Indometacin behandelt wurden, nach medikamentöser Therapie mit Ranolazin eine ebenfalls signifikant geringere endotheliale Relaxation verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Indometacin (Paredes-Carbajal et al., 2011/2012). Dies zeigt, dass der Effekt der endothelabhängigen Relaxation zum Großteil abhängig ist von NO. Eine weitere Studie beschreibt die Hypothese, dass Ranolazin als Alpha 1 Antagonist fungiert und somit Endothel- und NO-unabhängig die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen steuert (Deng et al., 2012). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnte eine gesteigerte Relaxation bei Ratten Aorten nach Ranolazin Therapie und vorhergehender Kontraktion mit Noradrenalin gezeigt werden, wohingegen die Aorten, welche mit Endothelin 1 oder Thromboxan A2 vorkontrahiert wurden, keine Relaxation durch Ranolazin erbrachten. Der relaxierende und dilatierende Effekt durch Ranolazin könnte daher unabhängig sein von den Mediatoren, die durch das Endothel freigesetzt werden (Marchio et al., 2014). In der klinischen Studie von Deshmukh et al., (2009) wurde ein positiver Effekt von Ranolazin auf die Endothelfunktion nachgewiesen. In dieser Studie wurden 27 Patienten im Rahmen chronisch stabiler Angina Pectoris für 6 Wochen entweder mit 1000mg Ranolazin täglich oder einem Placebo in einer doppelt-verblindeten Crossover-Studie therapiert. Die endothelabhängige Relaxation wurde anhand des RH-PAT Indexes gemessen (EDV-RH-PAT Index: Endothel dependend Vasodilatation Reactive-Hyperemia-peripheral arterial tonometry). Das Resultat der

Studie zeigte eine signifikante Steigerung der endothelialen Dilatation anhand des erhöhten EDV-RH-PAT Indexes was bedeutet, dass die Gabe dieser Substanz zu einer Steigerung der endothelvermittelten Vasodilatation führt und somit einen günstigen Einfluss auf die Endothelfunktion besitzt. Der RH-PAT Index unter Placebo blieb unverändert. Der Index wurde mittels plethysmographischer Pulswellen-Messung an den Fingern bestimmt (Bonetti et al., 2004). Die Patienten der Ranolazin - Gruppe zeigten außerdem eine signifikante Abnahme von ADMA (asymmetrisches Dimethyl-Arginin), einem kardialen Risikofaktor, der einen Inhibitor der NO-Synthase darstellt (Böger et al., 2003; Deshmukh et al., 2009). Diese Reduktion des ADMA führte reaktiv zu einer Steigerung des NO und somit zu einer Verbesserung der Vasodilatation in Verbindung mit einer vermehrten Durchblutung der Koronararterien. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Endothelfunktion zwischen klinischer und der aktuellen experimentellen Studie könnten sich durch die Unterschiede der Messmethoden erklären, invasiv versus non-invasiv. Die Bestimmung der peripheren Endothelfunktion Mittels RH-PAT Index, als non-invasive Methode, bedarf jedoch einer genauen Messung am Kontrollfinger mit dem Ziel individuelle Unterschiede wie Hauttemperatur, Blutdruck und weitere Risikofaktoren (erhöhter BMI, Diabetes mellitus, Lebensalter, Geschlecht, Dyslipoproteinämie etc.) für die valide Berechnung zu minimieren. Ein Grund für die Unterschiede in der endothelunabhängigen Relaxation der Gefäße könnte zudem darin bestehen, dass Ranolazin in einigen Studien gesunden Tieren verabreicht wurde. Dies führt dann wiederum wohlmöglich zu einer verbesserten Endothelfunktion vermittelt durch direkte Substanzeffekte am gesunden Tier, im Sinne einer Primärprophylaxe.

6.1.2. Atherogenese in dem Modell der ApoE-Knockout Maus

In der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Zunahme atherosklerotischer Plaques in der Ranolazin/Ketokonazol Gruppe beobachtet werden. Die Ausbildung einer generalisierten Atherosklerose in ApoE Tieren erfolgt im Vergleich zum Menschen weitaus frühzeitiger, wobei die atheromatösen Plaques unter allen verfügbaren Tiermodellen die größten Übereinstimmungen mit menschlichen Atheromen bezüglich Prädispositionsstellen und Progression zeigen (Plump et al., 1992; Nakashima et al., 1994; Smith et al., 1997). Die Zunahme der Atherogenese in der vorliegenden Studie könnte dadurch erklärt werden, dass die Endothelfunktion durch Ranolazin/Ketokonazol vermindert wird, wodurch es dann zu einer

gesteigerten Aktivierung von Entzündungszellen mit gleichzeitig reduzierter NO Bioverfügbarkeit, sowie zur vermehrten Produktion des oxidativen Stresses innerhalb der Zelle kommt.

6.1.3. Plasmalipide im Modell der ApoE-Knockout Maus

Nach achtwöchiger hypercholesterinämischer Diät zeigte sich in der Gruppe der transgenen ApoE-Knockout Mäuse eine signifikante Zunahme des Gesamtcholesterins verglichen mit den Wildtyp-Tieren. Das LDL-Cholesterin zeigte ebenfalls einen klaren Anstieg in der ApoE Gruppe. Die Behandlung mit den Medikamenten Ranolazin und Ketokonazol in Kombinations- sowie Monotherapie zeigte keine signifikanten Veränderungen im Gesamtcholesterin verglichen mit den Kontrollgruppen, so dass die Pharmakotherapie wohl keinen Einfluss auf die Plasmalipide besitzt.

6.1.4. Vitalparameter im Modell der ApoE-Knockout Maus

Die Intervention der Tiere im Rahmen der Monotherapie mit Ketokonazol, sowie der Kombinationstherapie bestehend aus Ranolazin und Ketokonazol zeigte keine hämodynamischen Effekte bezogen auf Herzfrequenz (HF) und Blutdruck (RR), verglichen mit den unbehandelten ApoE und WT-Mäusen. Jedoch sind systolischer Blutdruck und Herzfrequenz signifikant geringer in den Wildtyp-Gruppen, verglichen mit der ApoE Kontrollgruppe. Die Studie von Nieminem et al., gelangte ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Therapie mit Ranolazin zwar zu einer gesteigerten Vasodilatation innerhalb der Aorta führte, jedoch ohne Einfluss auf die Herzfrequenz und den Blutdruck blieb (Nieminem et al., 2011). Dies ist ein positiver Nebeneffekt, da die meisten antianginösen Medikamente wie beispielsweise Nitrate und Betablocker eine starke hämodynamische Relevanz bezogen auf Hypotonien und Tachykardien als auch Bradykardien aufweisen. Aufgrund des Nebenwirkungsprofils werden diese Medikamente dann ab- oder umgesetzt (Wilson et al.; Chaitman et al., 2009; Belardinelli et al., 2004).

6.1.5. Fibrotisches Remodelling in der ApoE-Knockout Maus

Anhand der Sirius-Red Färbung konnte gezeigt werden, dass der Anteil des extrazellulären Kollagens (Typ I und Typ III) im Rahmen des fibrotischen Remodellings des Aortensinus in der Gruppe der unbehandelten ApoE-Tiere signifikant erhöht war im Vergleich zu den Wildtypen. Innerhalb der Interventionsgruppen Ranolazin in Kombination mit Ketokonazol wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung des Kollagenanteils nachgewiesen. Dies könnte ein weiterer Indikator für die Zunahme der endothelialen Dysfunktion sein, da Kollagen als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Arterienwand bei gesteigerter pathophysiologischer Produktion an der Ausbildung der Atherosklerose beteiligt ist (Shekhonin et al., 1985). Gerade im Hinblick auf die Hämostase ist die gesteigerte Kollagen Produktion ein Risiko für die Thrombozyten Adhäsion und somit ein entscheidender Schritt bei der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen (Tokumura et al., 1994; Gennero et al., 1999). Kollagen, als Protein der menschlichen Gefäßwand, dient der Aufrechterhaltung der Gefäßelastizität. Allerdings wird es in atheromatösen Plaques vermehrt produziert, was wiederum zu einer vaskulären Lumeneinengung führt (Barnes et al., 1999). Die Studie von Zanten et al., beschreibt die Hypothese, dass eine vermehrte Kollagen Typ I oder III Produktion ursächlich für die gesteigerte Thrombozyten Adhäsion an atheromatösen Plaques ist und somit zur Progression der Atherosklerose beitragen könnte (Zanten et al., 1994).

6.1.6. Anteil der Makrophagen im atheromatösen Plaque Anteil in der ApoE-Knockout Maus

Die Untersuchung der atherosklerotischen Plaque Zusammensetzung zeigte eine signifikante Reduktion des Plaque Makrophagen Anteils in beiden Interventionsgruppen im Rahmen der Ranolazin-Ketokonazol Kombinatiostherapie sowie der Ketokonazol Monotherapie im Vergleich zur ApoE Kontrollgruppe wobei diese Reduktion in der Ketokonazol Gruppe höher ausfiel, so dass davon ausgegangen werden kann dass dieser Effekt auf die Pharmakotherapie mit Ketokonazol zurückzuführen sein könnte. Der Makrophagen Anteil zeigte sich in der unbehandelten ApoE Gruppe am höchsten was daran liegt, dass aufgrund der hypercholesterinämischen Diät die Atherosklerose mit inflammatorischen Zellen und

somit gesteigerter Immunreaktion ausgeprägter war, verglichen mit den WT-Tieren. Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der Atherosklerose (Tedgui et al., 2006), da sie zahlreiche Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und TNF freisetzen (Galkina et al., 2009). Sie migrieren durch die Endothelzellschicht, phagozytieren oxidiertes LDL und werden zu sog. Schaumzellen was einen wesentlichen Bestandteil atherosklerotischer Plaque darstellt. Des Weiteren kommt es zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ROS und zunehmenden Kernnekrosen (Ilhan et al., 2015). Ketokonazol ist ein Imidazol Derivat und gehört zur Gruppe der Antimykotika. Die Wirkung besteht in der Hemmung der Cholesterolsynthese durch Inhibition Cytochrom P 450 abhängiger Enzyme (Pont et al., 1982; Jeschke et al., 2012). Dadurch kommt es folglich zu einer reduzierten Cortisolsynthese (Pont et al., 1982) mit dem Effekt, dass die Zytokinfreisetzung und Makrophagen Aktivierung vermindert wird. Die Hemmung der Cortisolsynthese als körpereigenes Stresshormon könnte der Grund sein für den verringerten Makrophagen Anteil innerhalb der atheromatösen Plaques in dieser Studie.

6.1.7. Anteil reaktiver Sauerstoffspezies in der ApoE-Knockout Maus

In der vorliegenden Studie konnte durch die DHE Färbemethode kein erhöhter Anteil an Superoxidradikalen in der Gruppe der unbehandelten ApoE ^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Ranolazin und Ketokonazol hatte ebenfalls keinen Effekt auf den oxidativen Stress. Im Gegensatz hierzu zeigte eine experimentelle Untersuchung von Aldakkak et al., an Schweine Aorten, dass die Hemmung der spannungsabhängigen Ca-Kanäle durch Ranolazin den Ca- Überschuss und somit den oxidativen Stress innerhalb der Zelle signifikant reduziert. (Aldakkak et al., 2011).

6.2. Fazit

Die Abnahme der endothelialen Funktion innerhalb der Studie der ApoE-Knockout-Maus durch Ranolazin lässt sich nicht eindeutig erklären. In den klinischen Studien zeigte sich im Vergleich eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion vermittelt durch die Gabe von Ranolazin. Die Diskrepanz der klinischen Studien zu unserer experimentellen Studie liegt möglicherweise in unserem Modellversuch, wohingegen die ApoE Knockout Maus als Modell sehr gut validiert ist. Ebenfalls möglich ist eine zu geringe Dosierung des Ranolazins in der täglichen Dosis von 600mg/kg/Tag, wobei die Dosierung im Literaturvergleich sehr hoch ist. Eine weitere mögliche Ursache der Ergebnis Diskrepanz der zahlreichen Studien könnte in der Tatsache liegen, dass die Versuchstiere in der vorliegenden Studie mit Ranolazin behandelt wurden, allerdings parallel mit der hypercholesterinämischen Diät. Dies entspräche somit einer Primärprophylaxe. Ein weiteres Modell wäre die Ranolazin Therapie erst nach Ausbildung der generalisierten Atherosklerose, also im Rahmen der Sekundärprophylaxe, zu beginnen. Da der Wirkmechanismus von Ranolazin nicht eindeutig erklärt werden kann, bedarf es in Zukunft weiteren Studien da das Medikament aktuell zur Behandlung der stabilen Angina pectoris eingesetzt wird.

Literaturverzeichnis

1. Agabiti-Rosei E, Porteri E, Rizzoni D. Arterial stiffness, hypertension, and rational use of nebivolol. *Vasc Health Risk Manag*, 2009; 5:353-60
2. Antzelevitch C, Belardinelli L, Zygmunt AC, Burashnikov A, Di Diego JM, Fish JM, Cordeiro JM, Thomas G. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*. 2004 Aug 24;110(8):904-10
3. Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, Yang M, Stowe DF. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res*. 2011 Oct;64(4):381-92
4. Alexanderson E, García-Rojas L, Jiménez M, Jácome R, Calleja R, Martínez A, Ochoa JM, Meave A, Alexanderson G. Effect of ezetimibe-simvastatine over endothelial dysfunction in dyslipidemic patients: assessment by ¹³N-ammonia positron emission tomography. *J Nucl Cardiol*. 2010 Dec;17(6):1015-22
5. Aldakkak M, Stowe DF, Camara AK. Safety and Efficacy of Ranolazine for the Treatment of Chronic Angina Pectoris. *Clin Med Insights Ther*. 2013 Jan 15;2013(5):1-14
6. Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol*. 1999 Jul;34(4):513-25
7. Baszczuk A, Kopczyński Z, Thielemann A. [Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2014 Jan 30;68:91-100

8. Bello N, Mosca L. Epidemiology of coronary heart disease in women. *Prog Cardiovasc Dis*. 2004 Jan-Feb;46(4):287-95
9. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003 Oct 1;59(4):824-33
10. Bonetti PO, Gadasalli SN, Lerman A, Barsness GW. Successful treatment of symptomatic coronary endothelial dysfunction with enhanced external counterpulsation. *Mayo Clin Proc*. 2004 May;79(5):690-2
11. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Dec 7;44(11):2137-41
12. Bunch TJ, Mahapatra S, Murdock D, Molden J, Weiss JP, May HT, Bair TL, Mader KM, Crandall BG, Day JD, Osborn JS, Muhlestein JB, Lappe DL, Anderson JL. Ranolazine reduces ventricular tachycardia burden and ICD shocks in patients with drug-refractory ICD shocks. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2011 Dec;34(12):1600-6
13. Burashnikov A, Belardinelli L, Antzelevitch C. Atrial-selective sodium channel block strategy to suppress atrial fibrillation: ranolazine versus propafenone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jan;340(1):161-8
14. Busse R, Fleming I (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 24:24-9
15. Chaitman BR. Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions. *Circulation*. 2006 May 23;113(20):2462-72

16. Chandler MP, Stanley WC, Morita H, Suzuki G, Roth BA, Blackburn B, Wolff A, Sabbah HN. Short-term treatment with ranolazine improves mechanical efficiency in dogs with chronic heart failure. *Circ Res*. 2002 Aug 23;91(4):278-80
17. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):539-41
18. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11:194-205
19. Christensen FH, Hansen T, Stankevicius E, Buus NH, Simonsen U (2007) Elevated pressure selectively blunts flow-evoked vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol*;150:80-7
20. De la Lande IS, Stafford I, Horowitz JD. Heterogeneity of glyceryl trinitrate response in isolated bovine coronary arteries. *Eur J Pharmacol*. 1996 Dec 27;318(1):65-71
21. Deng CY, Kuang SJ, Rao F, Yang H, Fang XH, Shan ZX, Li XH, Zhou ZL, Lin QX, Yang M, Wu SL, Yu XY, Lin SG. Effect of ranolazine on rat intrarenal arteries in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2012 May 15;683(1-3):211-6
22. Den Uil CA, Caliskan K, Lagrand WK, van der Ent M, Jewbali LS, et al. Dose-dependent benefit of nitroglycerin on microcirculation of patients with severe heart failure. *Intensive Care Med*, 2009; 35:1893–1899
23. Den Uil CA, Lagrand WK, Spronk PE, van der Ent M, Jewbali LS, et al. Low-dose nitroglycerin improves microcirculation in hospitalized patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2009; 11:386–390

24. Den Uil CA, Lagrand WK, van der Ent M, Nieman K, Struijs A, Jewbali LS, Constantinescu AA, Spronk PE, Simoons ML. Conventional hemodynamic resuscitation may fail to optimize tissue perfusion: an observational study on the effects of dobutamine, enoximone, and norepinephrine in patients with acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. *PLoS One*. 2014 Aug 1;9(8):e103978
25. Deshmukh SH, Patel SR, Pinassi E, Mindrescu C, Hermance EV, Infantino MN, Coppola JT, Staniloae CS. Ranolazine improves endothelial function in patients with stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2009 Aug;20(5):343-7
26. Do AN, Irvin MR, Lynch AI, Claas SA, Boerwinkle E, Davis BR, Ford CE, Eckfeldt JH, Tiwari HK, Limdi NA, Arnett DK. The effects of angiotensinogen gene polymorphisms on cardiovascular disease outcomes during antihypertensive treatment in the GenHAT study. *Front Pharmacol*. 2014 Sep 16;5:210
27. Fok H, Guilcher A, Li Y, Brett S, Shah A, Clapp B, Chowienczyk P. Augmentation pressure is influenced by ventricular contractility/relaxation dynamics: novel mechanism of reduction of pulse pressure by nitrates. *Hypertension*. 2014 May;63(5):1050-5
28. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-97
29. Gaziano JM, Greenland P. When should aspirin be used for prevention of cardiovascular events? *JAMA*. 2014 Dec 17;312(23):2503-4
30. Gennero I, Xuereb JM, Simon MF, Girolami JP, Bascands JL, Chap H, Boneu B, Sié P. Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca⁺⁺

of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Res.* 1999 Jun 1;94(5):317-26

31. Gersch C, Dewald O, Zoerlein M, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem Cell Biol.* 2002 Jul;118(1):41-9
32. Gitt AK, Zahn R. [Antithrombotic treatment in patients with stable coronary artery disease. Which drugs and for how long?]. *Herz.* 2014 Nov;39(7):798-802
33. Godfraind T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014 Nov;19(6):501-15
34. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. 2009 Mar;73(3):411-8
35. Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 10):1671-6.
36. Hume DA, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med.* 1983 May 1;157(5):1704-9
37. Hume DA, Robinson AP, MacPherson GG, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med.* 1983 Nov 1;158(5):1522-36

38. Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases*. 2015 Apr 16;3(4):345-52
39. Jang IK, Lassila R, Fuster V. Atherogenesis and inflammation. *Eur Heart J*. 1993 Dec;14 Suppl K:2-6
40. Jerling M, Huan BL, Leung K, Chu N, Abdallah H, Hussein Z. Studies to investigate the pharmacokinetic interactions between ranolazine and ketoconazole, diltiazem, or simvastatin during combined administration in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*. 2005 Apr;45(4):422-33
41. Jeschke MG, Williams FN, Finnerty CC, Rodriguez NA, Kulp GA, Ferrando A, Norbury WB, Suman OE, Kraft R, Branski LK, Al-mousawi AM, Herndon DN. The effect of ketoconazole on post-burn inflammation, hypermetabolism and clinical outcomes. *PLoS One*. 2012;7(5):e35465
42. Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O (1995) A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25:1111-5
43. Kubes P, Suzuki M, and Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:4651-5
44. Lancellotti P, Pierard LA, Scheen AJ. Acute coronary syndrome and lipid lowering therapy. Does the improve it study make any difference? *Rev Med Liege*, 2015, Sep; 70(9):450-5
45. LeBlanc M, Zuber V, Andreassen BK, Witoelar A, Zeng L, Bettella F, Wang Y, McEvoy LK, Thompson WK, Schork AJ, Reppe S, Barrett-Connor E, Ligthart S, Dehghan A, Gautvik KM, Nelson CP, Schunkert H, Samani NJ, Ridker PM, Chasman DI, Aukrust P, Djurovic S, Frigessi A, Desikan RS, Dale A, Andreassen OA. Identifying Novel Gene Variants in Coronary Artery Disease

and Shared Genes with Several Cardiovascular Risk Factors. *Circ Res.* 2016 Jan 8;118(1):83-94.

46. Li R, Lawson JA, Probert KJ, Diamond SL, Blair IA, FitzGerald GA, Grosser T. Differential impairment of aspirin-dependent platelet cyclooxygenase acetylation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):16830-5
47. Marios Margaritis, Keith M Channon, Charalambos Antoniades. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: Beyond lipid lowering. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Mar10;20(8):1198-1215
48. Mohana T, Navin AV, Jamuna S, Sakeena Sadullah MS, Niranjali Devaraj S. Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins-in vivo and in vitro study. *Food Chem Toxicol,* 2015 Aug;82:96-105
49. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14:133-40
50. Nieminen T, Tavares CA, Pegler JR, Belardinelli L, Verrier RL. Ranolazine injection into coronary or femoral arteries exerts marked, transient regional vasodilation without systemic hypotension in an intact porcine model. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011 Oct 1;4(5):481-7
51. Paredes-Carbajal MC, Monsalvo I, Hernández-Díaz C, Regla I, Demare P, Mascher D. Effects of ranolazine on vasomotor responses of rat aortic rings. *Arch Med Res.* 2013 Jan;44(1):8-12

52. Patel MR, Peterson ED, Dai D et al. Low diagnostic yield of elective coronary angiography. *N Engl J Med* 2010; 362:886–95
53. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol.* 1996 Jul;118(6):1433-40
54. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-53
55. P Marchio, MD Mauricio, FB El Amrani, S Guerra, D Aguirre-Rueda, SL Vallés, JM Vila, M Aldasoro. Anti-adrenergic effects of ranolazine in isolated rat aorta. *Critical Care* 2014, 18 (Suppl 1): P184
56. Pont A, Williams PL, Loose DS, Feldman D, Reitz RE, Bochra C, Stevens DA. Ketoconazole blocks adrenal steroid synthesis. *Ann Intern Med.* 1982 Sep;97(3):370-2
57. Rastogi S, Mishra S, Gupta RC, Blackburn B, Belardinelli L, Stanley WC, Sabbah HN. Ranolazine combined with enalapril or metoprolol prevents progressive LV dysfunction and remodeling in dogs with moderate heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Nov;295(5):H2149-55
58. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993 Apr 29;362(6423):801-9
59. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126

60. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*. 1976 Sep 17;193(4258):1094-100
61. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977 Mar;86(3):675-84
62. Schächinger V, Zeiher AM. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 9:IX/70-4
63. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):197-201
64. Schulz R, Triggle. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Jul;15(7):255-9
65. Schwartz CJ, Kelley JL, Nerem RM, Sprague EA, Rozek MM, Valente AJ, Edwards EH, Prasad AR, Kerbacher JJ, Logan SA. Pathophysiology of the atherogenic process. *Am J Cardiol*. 1989 Oct 3;64(13):23G-30G
66. Scirica BM, Morrow DA, Hod H, Murphy SA, Belardinelli L, Hedgepeth CM, Molhoek P, Verheugt FW, Gersh BJ, McCabe CH, Braunwald E. Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency with Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial. *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):1647-52

67. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll Relat Res*. 1985 Sep;5(4):355-68
68. Singh RB, Sushuma A, Yan-Jun X, Amarjit S, Naranjan S. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp. Clin. Cardiol*, 2002 Spring; 7(1): 40–53.
69. Smith JD, Breslow JL (1997). The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 242:99-109
70. Sougat Ray, Surg Cdr, A.K. Jindal, Col, YSM, S. Sengupta, Lt Col, and S. Sinha, Lt Col. Statins: Can we advocate them for primary prevention of heart disease? *Med J Armed Forces India*. 2014 Jul; 70(3): 270–273
71. Stone PH, Gratsiansky NA, Blokhin A, Huang IZ, Meng L; ERICA Investigators. Antianginal efficacy of ranolazine when added to treatment with amlodipine: the ERICA (Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug 1;48(3):566-75
72. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI (1964). Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78:69-72
73. Tarkin JM. Pharmacological treatment of chronic stable angina pectoris. 2013 Feb;13(1):63-70
74. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):515-81

75. Timmis AD, Chaitman BR, Crager M. Effects of ranolazine on exercise tolerance and HbA1c in patients with chronic angina and diabetes. *Eur Heart J*. 2006 Jan;27(1):42-8
76. Tokumura A, Iimori M, Nishioka Y, Kitahara M, Sakashita M, Tanaka S. Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol*. 1994 Jul;267(1 Pt 1):C204-10
77. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan 24;16(1):202
78. Traub O, Ishida T, Ishida M, Tupper JC, Berk BC. Shear stress-mediated extracellular signal-regulated kinase activation is regulated by sodium in endothelial cells. Potential role for a voltage-dependent sodium channel. *J Biol Chem*. 1999 Jul 16;274(29):20144-50
79. Van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):615-32
80. Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-78
81. Walsh KB, Wolf MB, Fan J. Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2 Pt 2):H506-12
82. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T,

Münzel T (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99:2027-33

83. Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Thüneke F, Fröhlich M, Tschentscher P, Schwedhelm E, Böger R, Meinertz T, Münzel T (2007). AT1-receptor blockade with Irbesartan improves peripheral but not coronary endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis* 194:439-45

84. Wenger NK, Chaitman B, Vetrovec GW. Gender comparison of efficacy and safety of ranolazine for chronic angina pectoris in four randomized clinical trials. *Am J Cardiol.* 2007 Jan 1;99(1):11-8

85. Widmer Jay R. and Amir Lerman Endothelial dysfunction and cardiovascular disease *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014; 2014(3): 291–308

86. Wilson SR, Scirica BM, Braunwald E, Murphy SA, Karwatowska-Prokopczuk E, Buross JL, Chaitman BR, Morrow DA. Efficacy of ranolazine in patients with chronic angina observations from the randomized, double-blind, placebo-controlled MERLIN-TIMI (Metabolic Efficiency with Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes) 36 Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Apr 28;53(17):1510-6

87. Wimmer NJ, Stone PH. Anti-anginal and anti-ischemic effects of late sodium current inhibition. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Feb;27(1):69-77

88. Wu L, Shryock JC, Song Y, Belardinelli L. An increase in late sodium current potentiates the proarrhythmic activities of low-risk QT-prolonging drugs in female rabbit hearts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb;316(2):718-26

89. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. 1991 Nov;84(5):1984-92

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Professor Dr. Böhm und bei PD Dr. Dr. Schirmer für die Bereitstellung des Forschungsthemas bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Ihnen für den nötigen Freiraum und die intensiven Diskussionen bedanken, die zur Entwicklung meines wissenschaftlichen Denkens maßgeblich beitrugen und mir neben der Medizin einen anderen Blickwinkel auf die wissenschaftliche Welt ermöglichten. Außerdem gilt mein besonderer Dank Nina Rebmann für die Einarbeitung und die Weitergabe von Erfahrungen. Ohne sie wäre der praktische Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Sie hatte auch immer ein offenes Ohr für alle Probleme und baute mich gerade auch nach gescheiterten Experimenten immer neu auf. Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern Lothar und Elke Wolf, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützten.

